

**Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecene, offenkettige
Analoge und verwandte Strukturen als subtypselektive
Liganden an humanen klonierten Dopamin-Rezeptoren**

—

Synthese und Pharmakologie

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Thomas Wilhelm Wittig

geboren am 17. August 1973
in Haan/Rhld.

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. Lehmann, Jena
2. Prof. Dr. G. Scriba, Jena
3. Prof. Dr. P. Nickel, Bonn

Tag der Doktorprüfung:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1999 bis November 2003 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Jochen Lehmann angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Lehmann möchte ich herzlich danken für die Überlassung des interessanten Themas, seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, und besonders für die vielen interessanten Gespräche und seine überaus freundschaftliche und humorvolle Art.

Mein Dank gilt auch den Herren Prof. Dr. K. Mohr, Bonn und Prof. Dr. M. Hamburger, Jena und ihren Mitarbeitern für die Möglichkeit, meine Versuche im Isotopenlabor der jeweiligen Arbeitskreise durchführen zu können. Herrn Prof. Dr. G. Scriba und Herrn Prof. Dr. P. Nickel danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Danken möchte ich auch allen Kollegen in Bonn und Jena und besonders den Mitgliedern des Arbeitskreises für ihre vielfältige Unterstützung in fachlichen, wie in persönlichen Angelegenheiten, und für die durch sie geschaffene besondere, freundschaftliche und angenehme Atmosphäre.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Dorothea Diewald und Patrick Mohr für die gemeinsam erlebte Zeit im Labor, die mir viel Freude bereitet hat.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Michael Decker für die Einweisung in die pharmakologischen Arbeiten und für seine während der gesamten Zeit der Promotion gewährte freundschaftliche Unterstützung.

Allen Kooperationspartnern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich ebenfalls sehr herzlich, und möchte an entsprechender Stelle noch einmal einzeln auf sie verweisen.

Den technischen Mitarbeitern beider Institute in Bonn und Jena danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft.

Meiner Lebensgefährtin Ulla Steenken danke ich für das besonders aufmerksame Korrekturlesen des Manuskriptes und die liebevolle Unterstützung durch sie.

In den Wissenschaften ist viel Gewisses, sobald man sich von den Ausnahmen nicht irremachen läßt und die Probleme zu ehren weiß.

Goethe

Meinen lieben Eltern

	Inhaltsverzeichnis	I - IV
1	Einleitung	1
1.1	Schizophrenie	1
1.2	Klassifizierung und Wirkung bekannter Neuroleptika	4
1.3	Dopaminrezeptoren im Zentralnervensystem	8
1.3.1	Molekulare Charakteristika von Dopamin-Rezeptorsubtypen	8
1.3.2	Affinitätsprofile bekannter Liganden an Dopamin-Rezeptorsubtypen	10
1.4	Synthese und pharmakologische Testung potentieller Dopamin-Rezeptorliganden im Arbeitskreis	13
1.5	Ziel der Arbeit	16
2	Synthetischer Teil	19
2.1	Oxa-Homologe der Dibenz[<i>d,g</i>]azecine	19
2.1.1	Literaturbekanntes zur Synthese von Homologen der Dibenz[<i>d,g</i>]azecine	19
2.1.2	Syntheseplanung	24
2.1.3	Versuch der Synthese von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydro-dibenz[<i>g,j</i>]-1-oxa-4-azacycloundecen über 5-Phenyl-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin	25
2.1.4	Synthese von 3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[<i>g,j</i>]-1-oxa-4-azacycloundecen	29
2.1.4.1	Strukturelle Aspekte des 3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[<i>g,j</i>]-1-oxa-4-azacycloundecens	36

2.1.5	Synthese von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[<i>g,j</i>]-1-oxa-4-azacycloundecen-3-ol	38
2.2	Offenkettige Analoga der Dibenz[<i>g,j</i>]-1-oxa-4-azacycloundecene	45
2.2.1	Literaturbekanntes zur Synthese von (2-Benzylphenoxy)-alkylaminen	46
2.2.2	Syntheseplanung	47
2.2.3	Synthese der Reihe der [2-(2-Benzylphenoxy)ethyl]amine	48
2.2.4	Synthese des 1-[3-(2-Benzylphenoxy)propyl]pyrrolidins	51
2.2.5	Synthese des Phenyl[2-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)-phenyl]-methanons und Phenyl[2-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)-phenyl]-methanols	51
2.2.6	Synthese des <i>N</i> -(2-benzylphenyl)- <i>N</i> -(2-pyrrolidin-1-ylethyl)-amins	53
2.3	Synthese dimerer Dibenz[<i>d,g</i>]azecine mit unterschiedlich langen Alkylspacern als bivalente Dopamin-Rezeptorliganden	55
3	Pharmakologischer Teil - Methoden und Materialien	59
3.1	Herstellung von Ganzzeilsuspensionen	59
3.1.1	Eingesetzte gentechnisch veränderte Organismen	59
3.1.2	Arbeiten mit HEK- und CHO-Zellen	60
3.1.2.1	Inkulturnahme der Zellen	60
3.1.2.2	Vermehrung der Zellen	61
3.1.2.3	Ganzzeilsuspension	61
3.1.2.4	Einlagerung der Zellen	62

3.1.3	Bestimmung des Proteingehaltes	62
3.2	Radioligandbindungsstudien	63
3.2.1	Theoretische Grundlagen	63
3.2.2	Materialien	69
3.2.2.1	Radioliganden	69
3.2.2.2	Testsubstanzen	70
3.2.2.3	Reagenzien und Puffer	70
3.2.3	Versuchsdurchführung	71
3.2.3.1	Durchführung mit Glasfaserrundfiltern	72
3.2.3.2	Halbautomatische Durchführung mit Harvester	74
3.2.4	Bestimmung der K_D -Werte	76
3.3	Auswertung der Meßergebnisse	76
4	Pharmakologischer Teil – Ergebnisse	77
4.1	Charakterisierung der eingesetzten Zelllinien	77
4.2	Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien	77
5	Diskussion	85
5.1	Einfluß der Ringerweiterung bei Dibenz[d,g]azecinen auf die Affinität zu Dopamin-Rezeptorsubtypen	85
5.2	Vergleich der Bindungseigenschaften der elfgliedrigen Homooazecine hinsichtlich eines isosterischen Austausches einer Methylengruppe durch ein Sauerstoffatom	86

5.3	Vergleich der Bindungseigenschaften von methoxylierten und hydroxylierten Dibenz[d,g]azecinen und ihren elfgliedrigen Homologen	88
5.4	Auswirkung eines totalen Rigiditätsverlustes auf Affinität und Selektivität zu Dopamin-Rezeptorsubtypen anhand der offenkettigen Analoga der elfgliedrigen Ringsysteme	92
5.5	Bindungseigenschaften der dimeren Dibenz-azecine in Abhängigkeit von ihrer Spacerlänge	96
6	Funktionelle Untersuchungen	99
7	Zusammenfassung	100
8	Abstract	103
9	Experimenteller, synthetischer Teil	104
9.1	Allgemeine Angaben	104
9.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	104
9.3	Monographien	105
10	Abkürzungsverzeichnis	137
11	Literaturverzeichnis	139
	Publikationsverzeichnis	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

Unter dem Begriff Schizophrenie versteht man eine Gruppe endogener Psychosen, die, unabhängig von Rasse, Kulturkreis und äußeren Bedingungen, bei etwa einem Prozent der Bevölkerung auftritt. [1] Die Betroffenen erleben typische Symptome, die zum Teil sehr unterschiedlicher Natur sind und je nach Patient mehr oder weniger stark ausgeprägt sein können. Die Symptomatik ist gegliedert in einzelne Komplexe (Tab.1.1), deren von der WHO vorgeschlagene Einteilung die aufgrund der fehlenden biologischen Parameter oft komplizierte Diagnose der Schizophrenie erleichtern sollen. [2]

<i>Formale Denkstörungen</i>	Verzerrungen des Denkablaufs, unlogische Gedankengänge, absurde Wortneuschöpfungen.
<i>Wahn</i>	Fehlbeurteilung der Realität, Verfolgungs-, Beziehungs-Größenwahn, das Verhalten anderer wird wahnhaft auf sich selbst bezogen.
<i>Halluzinationen</i>	Wahrnehmung nicht vorhandener Sinneseindrücke und Tatsachen. Kann alle Sinnesorgane betreffen, am typischsten sind akustische Halluzinationen ("Stimmenhören").
<i>Ich-Störungen</i>	Die Grenzen zwischen Ich und Umwelt werden als durchlässig empfunden, Gefühl der Fremdbeeinflussung der eigenen Gedanken ("Gedankenentzug", "Gedankeneingebung"), Erleben einer wirklichen und einer wahnhaften Welt (s. Abb.1.1).
<i>Störungen der Affektivität</i>	Verminderung des emotionalen Kontaktes zu anderen Menschen, unangemessene Gefühlsäußerungen, gefühlsmäßige Verflachung nach Abklingen der akuten Erkrankung.
<i>Störungen des Willens und der Psychomotorik</i>	Interessenverminderung, Apathie, Bewegungslosigkeit oder motorische Unruhe.

Tab. 1.1: Symptomenkomplexe der Schizophrenie, nach ICD-10 [2].

Diese Symptomkomplexe können weiter unterteilt werden in positive und negative Symptome. Hierbei handelt es sich um Symptomatiken, die im Vergleich zum gesunden Menschen entweder "aufgelagert" (Positivsymptomatik) oder vermindert bzw. nicht vorhanden sind (Negativsymptomatik). Zu den positiven Symptomen gehören Halluzinationen, Wahnphänomene oder bizarres Verhalten. Zu den

**Abb. 1.1:**

*Jane of Roses:
"Reunion Try" aus der
Ausstellung "In der
Mitte des Randes" mit
Bildern von psychisch
kranken Künstlern aus
dem Bezirksklinikum
Regensburg im
Rahmen der Kunst-
therapie.*

negativen Symptomen gehören Affektverarmung, Apathie oder Aufmerksamkeitsstörungen. [3] Je nach Auftreten bestimmter Symptomkomplexe werden nach der International Classification of Diseases (ICD-10) [2] klinisch verschiedene Subtypen der Schizophrenie unterschieden:

<i>Paranoide S.</i>	Wahn, Halluzinationen
<i>Hebephrene S.</i>	Affektverflachung, Verhaltens- und Denkstörungen
<i>Katatone S.</i>	Psychomotorische Störungen (Stupor, Erregung etc.)
<i>Undifferenzierte S.</i>	Symptome, die keiner anderen oder mehreren anderen Subtypen zugeordnet werden können.
<i>Postschizophrene Depression</i>	Depressive Episode nach Schizophrenie
<i>Schizophrenes Residuum</i>	Negative Symptomatik, keine allg. Symptome einer Schizophrenie mehr nachweisbar.
<i>Schizophrenia simplex</i>	langsame Entwicklung negativer Symptome des schizophrenen Residuums, ohne Wahn oder Halluzinationen

Tab. 1.2: Subtypen schizophrener Psychosen nach ICD-10 [2]

Die Pathogenese der Schizophrenie ist multifaktoriell. Ihre Betrachtung kann gegliedert werden in neuropathologische Befunde, neurochemische Veränderungen, immunologische und schließlich genetische Befunde. [4]

Familien- und Zwillingsstudien haben gezeigt, daß das Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad steigt. So liegt das Risiko bei eineiigen Zwillingen bei ca. 50%, bei zweieiigen Zwillingen mit ca. 10% in der Größenordnung des Risikos von Geschwistern. Diese Studien zeigen auch, daß nicht ein Gen, sondern ein polygener Erbgang der Erkrankung zu Grunde liegt. [3]

Moderne bildgebende Verfahren führten zu Fortschritten in der Suche nach morphologischen Veränderungen des Gehirns psychisch Kranker. In einer Vielzahl von Studien konnten hierbei Veränderungen insbesondere der Hirnventrikel und der Liquorräume festgestellt werden. [3] Immunologische Veränderungen bei Patienten mit vor allem negativer Symptomatik führten zu Diskussionen über Infektionen mit Retroviren als möglichem ätiologischem Faktor.[4]

Die Vielfalt der Symptome und klinischen Verläufe der Krankheit läßt bereits auf ein komplexes, uneinheitliches Bild der ihr zu Grunde liegenden biochemischen Veränderungen schließen. [5] Im Zentrum des Interesses stand zunächst das dopaminerge System, ausgehend von der Tatsache, daß Dopaminantagonisten sich als wirksam in der Behandlung schizophrener Psychosen erwiesen, Dopaminagonisten (z. B. Amphetamine, Apomorphin) jedoch Psychosen auslösen konnten. Besonders eine Überfunktion des dopaminergen Systems und später auch eine Übersensitivität dopaminerger Rezeptoren wurden als Krankheitsauslöser diskutiert. [6] Die Entdeckung verschiedener Dopamin-Rezeptorsubtypen [7] rückte den D₂-Rezeptor in den Mittelpunkt des Interesses, da D₂-subtypspezifische antagonistische Liganden sich als wirksame Antipsychotika erwiesen. Andere Hypothesen weisen auch D₁-Antagonisten eine in Antipsychotikamodellen wirksame Rolle und eine Schlüsselfunktion in der Vermittlung der antipsychotischen Wirkung zu. [8] Die Einführung des atypischen Neuroleptikums Clozapin (s. 1.2) eröffnete zudem die Hypothese, daß eine Selektivität zum D₄-Rezeptor besonders günstige klinische Effekte hervorrufen kann. Obwohl die meisten der in der Therapie angewandten Neuroleptika D₂-Antagonisten darstellen (s. 1.3.2), werden zunehmend Gleichgewichtshypothesen formuliert, die neben dem dopaminergen System eine Beteiligung glutamaterger, serotonerger, cholinерger, GABAerger und peptiderger Systeme annehmen, da die symptomatische Vielfalt der Erkrankung sich experimentell nicht einer gemeinsamen biochemischen Grundstörung zuordnen läßt. Vielmehr geht man von labilen Gleichgewichten zwischen einzelnen Neurotransmissionssystemen aus, in denen das dopaminerge System eine zentrale Rolle einnimmt. [5] Im Übrigen

konnte festgestellt werden, daß unter Morbus Parkinson leidende Patienten eine Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra, also verminderte Dopaminspiegel aufwiesen. Diese Befunde unterstützen die Theorie, daß schizophrene Symptome ihren Grund in einer Hyperaktivität dopaminerger Neurone im zweiten wichtigen dopaminergen System, dem mesolimbischen, haben und nicht in dem für die Extrapiramidalmotorik verantwortlichen nigrostriatalen System. [9]

1.2 Klassifizierung und Wirkung bekannter Neuroleptika

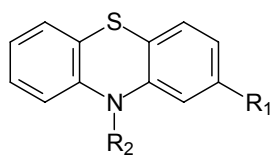
Neuroleptika sind Substanzen, die – insbesondere bei Schizophrenen – psychische (psychotische) Symptome bessern, ohne das Bewußtsein und die intellektuellen Fähigkeiten wesentlich zu beeinflussen. [10] Sie dämpfen vor allem die Positivsymptomatik und ermöglichen dem Patienten so eine Distanzierung von der Erkrankung. Neuere Vertreter ermöglichen zudem eine Behandlung der Minussymptomatik (atypische Neuroleptika, s.u.). Die Neuroleptika können aufgrund ihrer chemischen Struktur und gleichzeitig ihrer pharmakologischen Eigenschaften in folgende Klassen eingeteilt werden:

- trizyclische Neuroleptika (Phenothiazine und Phenothiazin-Analoga)
- Butyrophenone und Diphenylbutylpiperidine
- atypische Neuroleptika

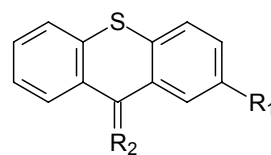
Die beiden ersten Klassen werden in Abgrenzung zu den *atypischen* Neuroleptika auch als *klassische* Neuroleptika bezeichnet.

Der Wirkmechanismus der Neuroleptika ist wie die Pathogenese der Schizophrenien nur unvollständig aufgeklärt. Sicher ist, daß alle Neuroleptika in die synaptische Neurotransmission eingreifen und modulierend auf deren kompliziertes Zusammenspiel einwirken. *Klassische* Neuroleptika wirken vorrangig über eine Blockade der Dopamin D₂-Rezeptorsubtypen, während bei den *atypischen* Neuroleptika eine Blockade anderer Rezeptorsubtypen hinzukommt. [10]

Die Klasse der Phenothiazine wurde ausgehend von Ihrer ursprünglichen Verwendung als Antihistaminika entwickelt und stellte mit Einführung des Chlorpromazins in die Therapie in den frühen fünfziger Jahren des vorigen Jahrhunderts den ersten Durchbruch in der Behandlung der Schizophrenien dar. [9] Strukturell kennzeichnet die Phenothiazine ein trizyklisches Ringsystem mit einer basischen Seitenkette in Position 10. Eine tertiäre Aminfunktion ist vom trizyklischen Ringsystem in der Regel durch drei C-Atome getrennt (**1**). Das Phenothiazin-Grundgerüst ist für die neuroleptische Wirkung jedoch nicht obligat. Planare Dreiringsysteme, wie die Thioxanthene (**2**) eignen sich in gleicher Weise. [10]

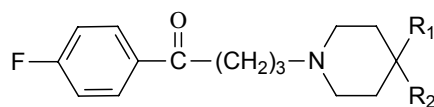
**1**

R₁ = H, Cl, CF₃, OCH₃, SCH₃
 R₂ = Alkylamine, Alkylpiperazine,
 Alkylpiperidine

**2**

R₁ = Cl, CF₃,
 R₂ = Alkylamine, Alkylpiperazine

Die ausgehend vom Pethidin entwickelten Butyrophenone (**3**) und Diphenylbutylpiperidine weisen als gemeinsames Strukturmerkmal eine viergliedrige Kette zwischen Aromat und Piperidinring auf.

**3**

R₁ = H, OH, CONH₂
 R₂ = CH₃, p-Chlorphenyl, p-Bromphenyl, Piperidinyl

Die Phenothiazine zeigen ein breites Wirkungsspektrum, da sie blockierend auf eine Reihe von Neurotransmitterrezeptoren wirken. Ihre neuroleptische Potenz, also die antipsychotische Wirkung bezogen auf die Dosierung des Neuroleptikums, ist bei den Derivaten mit aliphatischer Seitenkette am schwächsten, bei den Piperidin-substituierten Verbindungen etwas größer und bei Piperazin-substituierten Verbindungen am stärksten. Die neuroleptische Potenz der Butyrophenone entspricht etwa der der Phenothiazine mit Piperazin-Seitenkette. [11]

Der zentrale Wirkmechanismus der Neuroleptika besteht in der Blockade von Dopaminrezeptoren. Bis auf Clozapin wirken alle Neuroleptika antagonistisch an D₂-Rezeptoren. Ein starkes Argument für diese Hypothese ist die hervorragende Korrelation zwischen der Affinität zum D₂-Rezeptor und der antipsychotischen Dosis am Patienten. [13] Zusätzlich gestützt wird diese Hypothese durch Positronen-Emissions-Topographie am lebenden Patienten. [11] Die *klassischen* Neuroleptika wirken besonders günstig auf die Plusssymptomatik der Schizophrenien, auf die Negativsymptomatik zeigen sie jedoch kaum eine Wirkung.

Die Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren im zentralen Nervensystem ist allerdings auch verantwortlich für die die Therapie begleitenden Nebenwirkungen der *klassischen* Neuroleptika. So kommt es bei den durch Blockade von Dopaminrezeptoren im Striatum bedingten *extrapyramidal-motorischen Störungen* (EPS) zu Früh- und Spätdyskinesien, Parkinsonsyndromen, Akathisie und im schlimmsten Fall zum malignen neuroleptischen Syndrom. Bei den durch Blockade von Adrenorezeptor und Muscarinrezeptor bedingten *vegetativen* Nebenwirkungen kommt es z. B. zu orthostatischen Dysregulationen, Benommenheit, Obstipation und Miktionsstörungen. Infolge der Blockade von Dopaminrezeptoren im hypophysären Bereich kommt es zu *hormonellen* Störungen wie Hyperprolaktinämie, Gynäkomastie, Amenorrhö, sowie Libido- und Potenzverlust. [10]

Die *atypischen* Neuroleptika zeigen im Vergleich zu den *klassischen* Neuroleptika ein günstigeres Wirkprofil. So vermögen sie auch die Minussymptomatik günstig zu beeinflussen und rufen wesentlich weniger *extrapyramidal-motorische* Nebenwirkungen hervor (Abb. 1.2). Dies wird damit erklärt, daß die *atypischen* Substanzen das für die antipsychotische Wirkung besonders wichtige mesolimbische dopaminerge System im klinisch wirksamen Dosisbereich ausgeprägter als das für die EPS relevante nigro-striatale System beeinflussen (Abb. 1.3). Dies wird am Beispiel des Clozapins u.a. mit einer niedrigen D₂-Rezeptorbesetzung im nigro-striatalen System erklärt, wie es auch beim Haloperidol der Fall zu sein scheint. [12] Die Selektivität des Clozapins zum D₄-Rezeptor wird heute nicht mehr als Hauptgrund für seine Wirkung diskutiert, vielmehr wird auch dem Clozapin heute eine D₂-Blockade als Hauptwirkmechanismus zugeschrieben. [13]

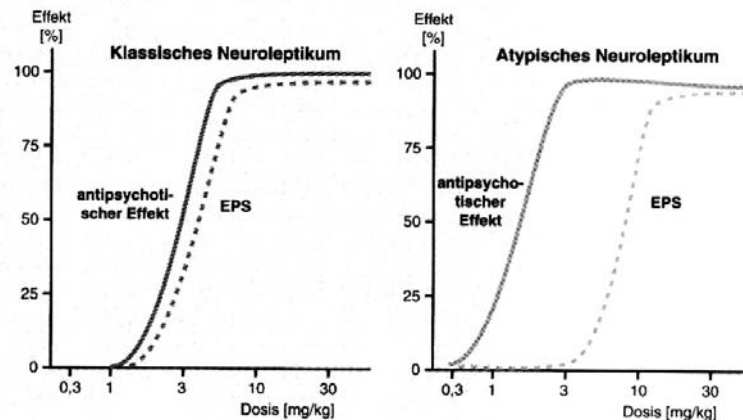


Abb. 1.2: Beziehung von Dosis und antipsychotischem Effekt zum Auftreten von extra-pyramidal-motorischen Störungen (EPS) bei klassischen und atypischen Neuroleptika. (aus [14])

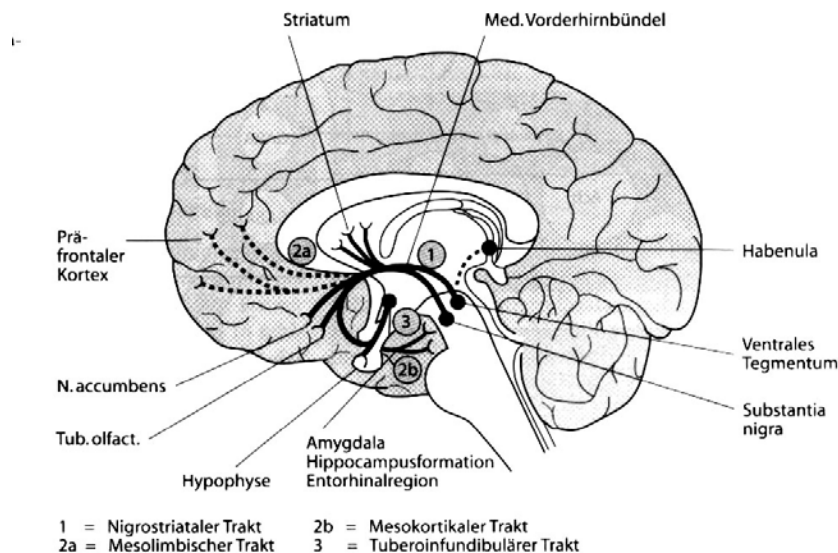
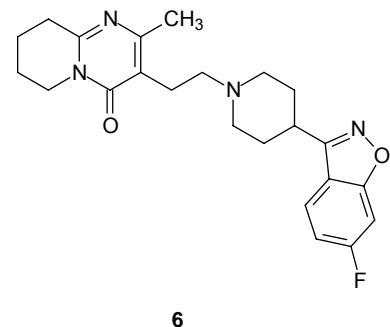
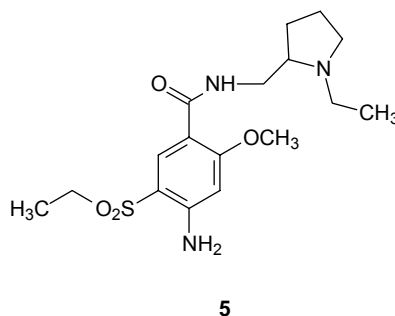
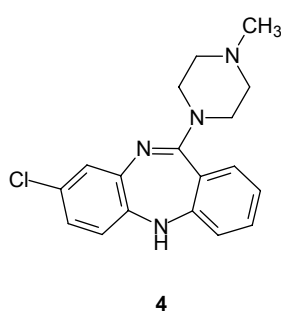


Abb. 1.3: Wichtige dopaminerge Bahnsysteme des ZNS (aus [3])

Strukturell können die atypischen Neuroleptika eingeteilt werden in die Gruppe der trizyklischen Verbindungen und die der Benzamide. Risperidon und Ziprasidon bilden chemisch eine eigene strukturelle Gruppe. Beispielhaft für diese drei Gruppen sollen hier das Clozapin (**4**), das Amisulpirid (**5**) und Risperidon (**6**) dargestellt werden:



1.3 Dopaminrezeptoren im Zentralnervensystem

Dopaminerge Nervenzellkörper finden sich im menschlichen Gehirn, wie bereits unter 1.2 erwähnt, im *nigro-striatalen*, im *mesolimbischen* und zudem im *tubero-infundibulären* System (s. Tab. 1.3). Das endogen aus Tyrosin und Dihydroxyphenylalanin (DOPA) entstandene Dopamin wird in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann mit postsynaptischen Dopaminrezeptoren wechselwirken. Ferner kann Dopamin seine eigene Freisetzung über präsynaptische Autorezeptoren hemmen. [11] Ende der siebziger Jahre des vorigen Jahrhunderts postulierten Keibian und Calne [7] die Existenz zweier Dopamin-Rezeptorsubtypen (D_1 und D_2). Sie stützten sich hauptsächlich auf biochemische und pharmakologische Studien, nach denen bestimmte Rezeptoren die dopamin-sensitive Adenylatcyclase stimulieren (D_1 -Typ), andere jedoch eine physiologische Antwort ohne Stimulation der Adenylatcyclase hervorrufen, wie z. B. die durch Dopamin induzierte Hemmung der Prolaktinfreisetzung (D_2 -Typ). Etwa zehn Jahre später ermöglichten neuartige Methoden die Klonierung von Genen, die für weitere Dopamin-Rezeptorsubtypen codierten. Als weiterer Rezeptor vom D_1 -Typ wurde der D_{1B} - oder D_5 -Subtyp gefunden, als weitere Vertreter des D_2 -Types wurden der D_3 - und der D_4 -Subtyp gefunden. Alle drei neuen Rezeptorsubtypen konnten einwandfrei der von Keibian und Calne eingeführten Einteilung in einen D_1 - und D_2 -Typ zugeordnet werden, und zwar aufgrund ihrer jeweiligen ausgeprägten Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen in den transmembranären Domänen, ihrer Affinitätsprofile zu bestimmten Liganden und ihrer unterschiedlichen Signaltransduktionsmechanismen, namentlich der positiven bzw. negativen Kopplung zur Adenylatcyclase. [15] Der am meisten verbreitete und im höchsten Grad exprimierte Rezeptor ist der D_1 -Subtyp. Dieser und der D_2 -Subtyp übertreffen zahlenmäßig weit die später gefundenen D_3 - bis D_5 -Subtypen.

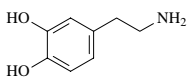
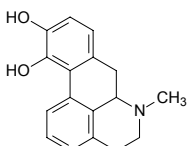
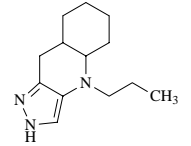
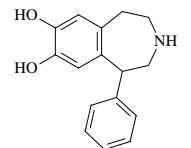
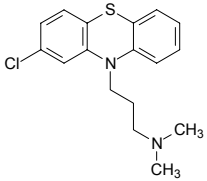
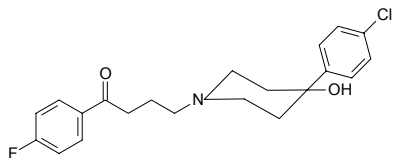
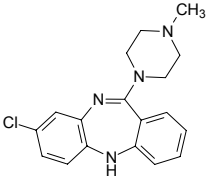
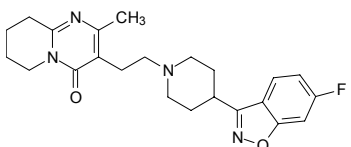
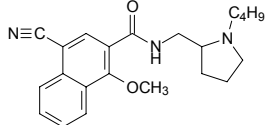
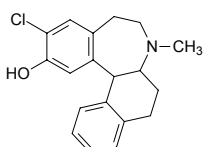
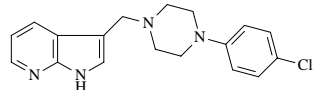
1.3.1 Molekulare Charakteristika von Dopamin-Rezeptorsubtypen

Genetisch unterscheiden sich beide Rezeptorfamilien durch die An- bzw. Abwesenheit von Introns innerhalb ihrer codierenden Sequenzabschnitte. Während der D_1 - und D_5 -Rezeptor keine Introns aufweist, weisen der D_2 -, der D_3 - und der D_4 -Rezeptor hier mehrere Introns auf (s. Tab. 1.3). Die Introns in den codierenden Sequenzabschnitten sind auch der Grund für das Vorliegen von Spleißvarianten der

Rezeptoren vom D₂-Typ. So besteht der D₂-Rezeptor aus zwei Isoformen: dem D_{2S(short)}- und dem D_{2L(long)}-Rezeptor. Spleiß- und Polymorphievarianten sind ebenso für den D₃-Rezeptor wie für den D₄-Rezeptor (D_{4.2}, D_{4.4}, D_{4.7} und andere) identifiziert worden. [16] Strukturell sind alle Dopaminrezeptoren eindeutig der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen zuzuordnen. (Abb. 1.4) Die Rezeptoren vom D₁- und D₂-Typ unterscheiden sich strukturell hauptsächlich darin, daß bei den D₁- und D₅-Rezeptoren die dritte cytoplasmatische Schleife wesentlich kürzer und das intrazelluläre C-terminale Ende wesentlich länger ist als bei den Mitgliedern der D₂-Rezeptorfamilie. Dies wird als ein Charakteristikum für G_s-gekoppelte Rezeptoren, die die Adenylatcyclase stimulieren, angesehen. [17] Mutageneseexperimente konnten zeigen, daß die Bindung von Liganden vom Catecholamintyp innerhalb der hydrophoben transmembranären Domänen (TMD) G-Protein - gekoppelter Rezeptoren stattfindet (s. Abb. 1.4). An D₁- und D₂-Rezeptoren konnten bisher ein Aspartatrest in TMD 3, sowie drei Serinreste in TMD 5 als in die Ligandbindung involvierte Bestandteile des Rezeptors identifiziert werden. [15, 18]

	D ₁ -Typ		D ₂ -Typ			
	D ₁	D ₅	D _{2S}	D _{2L}	D ₃	D ₄
Anzahl	446 (r)	475 (r)	415 (r)	444 (r)	446 (r)	387 (r)
Aminosäuren	446 (h)	477 (h)	414 (h)	443 (h)	440 (h)	385 (h)
Introns	0	0	6		5	3
Signaltransduktion	G _s AC↑	G _s AC↑	G _i AC↓ Ca ²⁺ influx↓ K ⁺ efflux↑		G _i AC↓ Ca ²⁺ influx↓	G _i AC↓ Ca ²⁺ influx↓
mRNA Vorkommen im ZNS (s. auch Abb. 1.3)	Striatum, Nucleus accumbens, Tuberculum olfactorium, limbisches System, Hypothalamus, Thalamus	Hippocampus, Hypothalamus	Striatum, Nucleus accumbens, Tuberculum olfactorium, Substantia nigra, Hypothalamus		Nucleus accumbens, Tuberculum olfactorium, Substantia nigra	Frontaler Cortex, Amygdala, Hippocampus, Hypothalamus, Mesencephalon

Tab. 1.3: Dopaminrezeptoren: Molekulare Charakteristika, modifiziert nach: [15] und [17];
D_{2S}: D_{2(short)}, D_{2L}: D_{2(long)}, r: Ratte, h: human, G_s, G_i: G-Proteine, AC: Adenylatcyclase

		D₁	D₂	D₃	D₄	D₅
Agonisten						
Dopamin		3405	400	40	300	228
Apomorphin		540	42	27	3,5	363
Quinpirol		>10.000	2,8	43	0,2	-
SKF 38393		150	>10.000	>10.000	-	100
Antagonisten						
Chlorpromazin		58,5	6,1	2,3	8,6	133
Haloperidol		210	0,7	2	3	113
Clozapin		168	112	416	35	265
Risperidon		523	2,1	5,1	2,3	563
Nafadotrid ^a		890	3,0	0,31	1,8	-
SCH 39166 ^a		5,0	3750	1000	5900	4,4
L-745870 ^c		-	960	2300	0,43	-

Tab.1.4: K_i -Werte in [nM] an humanen, klonierten Rezeptoren aus [20], ^a: aus [23], ^c: aus [22]

In der Literatur finden sich überwiegend D₂-Typ-selektive Liganden, wie auch in der oben stehenden Tabelle deutlich wird. Es finden sich jedoch kaum Substanzen, die eine ausgeprägte Selektivität zu einem bestimmten Dopamin-Rezeptorsubtyp zeigen. Da man eine gewisse Zeit lang das günstige klinische Wirkprofil des Clozapins seiner, wenn auch nur schwach ausgeprägten, D₄-Selektivität zuschrieb, suchte man nach selektiveren D₄-Liganden und fand 1997 bei der Firma Merck schließlich die Verbindung **L-745870**, die sich als hochaffin zum D₄-Rezeptor erwies und eine zwei- bzw. fünftausendfache (!) Selektivität gegenüber dem D₃- und D₄-Rezeptor zeigte (s. Tab. 1.4). In klinischen Studien erwies sie sich jedoch als nicht antipsychotisch wirksam, woraus verschiedene Autoren den Schluß zogen, daß zum einen die antipsychotische Wirkung eher dem D₂- und D₃-Rezeptor zuzuschreiben ist, und daß zum anderen für das atypisch antipsychotische Wirkprofil des Clozapins nicht die Aktivität an einem einzelnen Rezeptor, sondern das gesamte Affinitätsprofil entscheidend ist. [12, 22] Als Beispiel für eine D₃-selektive Verbindung dient das Nafadotrid, wenn diese Selektivität gegenüber dem D₂-Rezeptor auch nur moderat ausfällt. (D₃ zu D₂: ~10-fach, s. Tab. 1.4).

Als zwei der wenigen bekannten und in klinischen Studien getesteten Vertreter D₁-Typ selektiver antagonistischer Liganden seien die von der Firma Schering entwickelten Verbindungen **SCH 23390** und **SCH 39166** erwähnt. Sie zeigen jedoch keine Selektivität innerhalb der D₁-Rezeptorfamilie, ebenso wenig wie der D₁-Typ-Agonist **SKF 38393**. (s. Tab. 1.4 und [21]) Das pharmakologische Profil von D₁-Typ-Liganden in antipsychotischen Verhaltensmodellen an Tieren wird in der Literatur zusammenfassend als dem der D₂-Rezeptorliganden ähnlich eingestuft. Vor allem von dem bei **SCH 23390** beobachteten Antagonismus mesolimbischer dopaminerger Neurone bei relativ geringer Rezeptorbesetzung versprach man sich ein günstiges Nebenwirkungsprofil. [8,9] In jüngeren klinischen Studien, auch mit neueren D₁-selektiven Liganden, konnte jedoch bei beiden Schering-Verbindungen keine Verbesserung schizophrener Symptome festgestellt werden. [21], [23] Die weitere Entwicklung subtypspezifischer Liganden an Dopaminrezeptoren erscheint jedoch, wie auch diesen Ergebnissen zu entnehmen ist, wichtig für das Verständnis der Bedeutung der einzelnen Rezeptoren in der Therapie der Schizophrenien. Gerade das Wissen über die neurophysiologische Bedeutung der D₁-Rezeptoren ist begrenzt, obwohl sie von allen Dopaminrezeptoren am häufigsten im menschlichen Vorderhirn vorkommen. Über den D₅-Rezeptor ist diesbezüglich nichts bekannt. [23]

1.4 Synthese und pharmakologische Testung potentieller Dopamin-Rezeptorliganden im Arbeitskreis

Im Arbeitskreis wurden verschiedene Verbindungen mit für diese Arbeit relevanten Grundstrukturen synthetisiert und pharmakologisch untersucht. Das von Thomas Witt zuerst synthetisierte **LE 300 (7)** stellt strukturell eine "Symbiose" der beiden Grundgerüste von Dopamin und Serotonin dar (Abb. 1.5) und sollte so als Leitstruktur zu neuartigen Dopamin – Rezeptorliganden führen. Die Auswirkungen der Rigidisierung der Arylalkylaminstrukturen beider Monoamine im **LE 300** auf ihre Bindungseigenschaften hinsichtlich Affinität und Selektivität zu den einzelnen Dopamin-Rezeptorsubtypen wurden umfangreich untersucht. [24, 25, Tab.1.5]

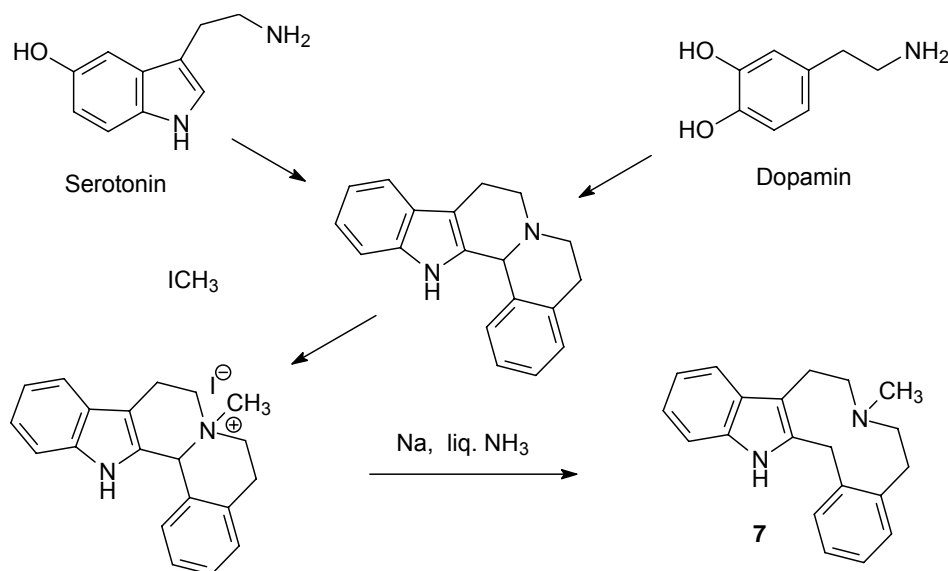


Abb. 1.5: Vereinfachtes Syntheschema von **LE 300**

Im Folgenden wurden von verschiedenen Mitgliedern des Arbeitskreises eine Reihe von Strukturvariationen am **LE 300** durchgeführt, mit dem Ziel, Struktur-Wirkungs-Beziehungen erstellen zu können. (Abb. 1.6)

Das pharmakologische Screening mit Hilfe eines funktionellen Calcium-assays an Dopamin-Rezeptorsubtypen [26] erbrachte jedoch ähnlich hochaffine Bindungseigenschaften ($K_i < 100 \text{ nM}$), wie sie das **LE 300** besitzt, nur für das N-Ethyl-Derivat des **LE 300**, sowie für die Dibenz[*d,g*]- und die Benz[*d*]thieno - Analoga (**8,9**) des **LE 300**.

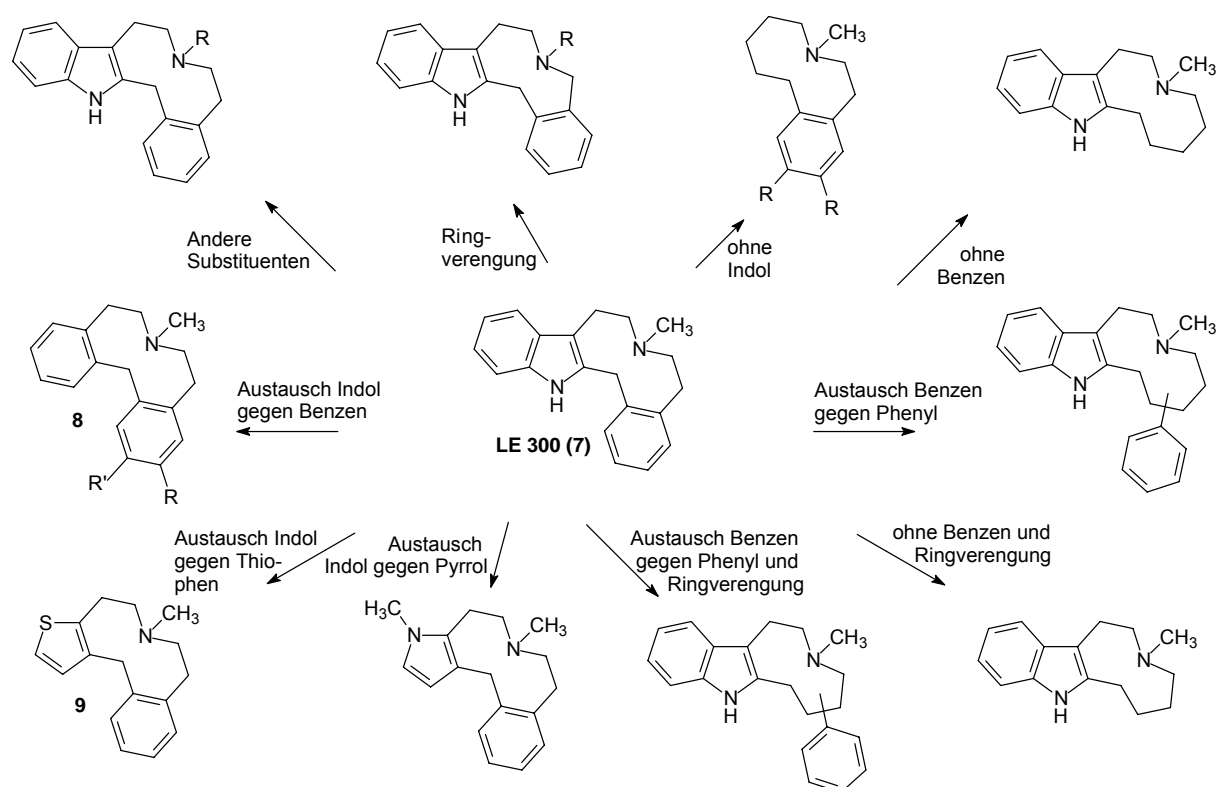


Abb. 1.6: Strukturvariationen von **LE 300**

Im Folgenden sollen daher von den ebenfalls von Mitgliedern des Arbeitskreises durchgeführten weiteren Bindungsstudien und funktionellen Untersuchungen nur die mit **LE 300** und der affinsten Substanz der Dibenz[*d,g*]azecin-Reihe, dem **LE 404**, durchgeführten Testungen zusammengefaßt werden (Tab. 1.5). [25-28] Diese Substanz ist pharmakologisch und strukturell besonders interessant, da sie als einzige einen subnanomolaren K_i -Wert am humanen, klonierten Dopamin- D_1 -Rezeptor zeigt, und sich mit einer Monohydroxysubstitution in 3-Stellung dem 3,4-dihydroxy-substituierten Derivat überlegen zeigt. Dies erscheint mit Blick auf das Dopamin mit seiner 3,4-Dihydroxystruktur überraschend.

Beide Substanzen stellen also hochaffine Liganden an Dopaminrezeptoren mit einer signifikanten Selektivität zum D_1 -Rezeptorsubtyp dar. Die funktionellen Untersuchungen zeigten für beide Substanzen antagonistische Eigenschaften.

Auffällig ist die Diskrepanz der K_i -Werte des **LE 300** an D_1 -Rezeptoren der Ratte und des Menschen. Aus der obigen Tabelle läßt sich ein Verhältnis von knapp 1:25 bzw. 1:60 zugunsten der rD_1 -Rezeptoren gegenüber rekombinanten hD_1 -Rezeptoren feststellen.

Rezeptor	D ₁		D _{2L}		D ₃		D _{4,4}		D ₅		5-HT _{2A}	
Testsubstanz	LE 300	LE 404	LE 300	LE 404	LE 300	LE 404	LE 300	LE 404	LE 300	LE 404	LE 300	LE 404
Radioligandbindung												
Rattenstriatum	0,08	-	6,0	-	-	-	-	-	-	-	20,0	-
humane rekombinante Rezeptoren in CHO-Membranen	1,9	-	44,7	-	-	-	109	-	7,5	-	-	-
hum. rek. Rez. in intakten HEK-293-Zellen	4,9	0,49	83,4	17,5	87 ^a	-	108,5	11,3	7,5	1,5	-	-
Funktionelle Assays												
[³⁵]GTPγS an hum. rek. Rez. in HEK-293-Membranen	1,8	-	21,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cAMP an hum. rek. Rez. in intakten HEK-293-Zellen	25,9	-	5,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca ²⁺ an hum. rek. Rez. in intakten HEK-293-Zellen	60,4	6,93	19,0	33,5	-	-	-	-	12,7	1,69	-	-
Rattenschwanzarterie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,8 ^b	9,16 ^b

Tab.1.5: Zusammenfassung von Bindungs- und funktionellen Daten von **LE 300** und **LE 404** an allen Dopamin-Rezeptorsubtypen, sowie dem 5-HT_{2A}-Rezeptor. Angegeben sind K_i-Werte in [nM]. Daten aus [b,c,d,e], ^a: Receptor binding screening beim NIH(cocaine treatment discovery programme), unveröffentlichte Ergebnisse ^b: pA₂-Wert

Ein möglicher Grund hierfür könnte die Durchführung der Bindungsversuche zum einen im physiologischen Milieu am Rattenstriatum und zum anderen an rekombinanten Rezeptoren in künstlich gezüchteten Zelllinien sein. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz beider Rezeptoren zeigt eine Übereinstimmung von 91% aller Aminosäuren im rD₁- und hD₁-Rezeptor und eine 96%ige Übereinstimmung in den transmembranären Domänen. [17] Die hier lokalisierten Aminosäuren, die bisher in der Literatur für die Bindung potentieller Rezeptorliganden verantwortlich gemacht wurden (s. 1.3.1), unterscheiden sich nicht, wie ein *Pairwise Sequence Alignment* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/alignment.html>) beider Sequenzen zeigt, so daß strukturelle Unterschiede der beiden Rezeptoren als Grund für die unterschiedliche Affinität des **LE 300** zum rD₁- bzw. hD₁-Rezeptor unwahrscheinlich sind. Da Erkenntnisse über die genaue Bindungsstelle des **LE 300** am D₁-Rezeptor aber fehlen, kann dies auch nicht ausgeschlossen werden.

Als weitere für diese Arbeit relevante Strukturvariation des **LE 300** wurden im Arbeitskreis verschiedene Dimere dieser Verbindung mit unterschiedlich langen Alkylspacern als potentielle bivalente Liganden an Dopaminrezeptoren synthetisiert und in Radioligandbindungsstudien getestet. [29]

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit sollte es sein, neuartige Dopamin-Rezeptorliganden synthetisch zugänglich zu machen, und diese in Radioligandbindungsstudien auf ihre Affinität zu Dopaminrezeptoren zu screenen. In dieses Screening sollten auch andere im Arbeitskreis synthetisierte Verbindungen eingeschlossen werden, um schließlich Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) hinsichtlich bestimmter Partialstrukturen in den Ligandmolekülen aufstellen zu können und eine zielorientierte synthetische Arbeit zu ermöglichen. Auch wurden Aussagen bezüglich der funktionellen Eigenschaften der Zielverbindungen angestrebt.

Ausgehend von den in 1.4 beschriebenen pharmakologischen Studien, in denen sich das **LE 404** als die bis dato affinste der im Arbeitskreis dargestellten Verbindungen erwies, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Reihe der Dibenz[*d,g*]azecine weiter strukturell variiert werden. Zum einen sollte der zentrale zehngliedrige Ring zu einem elfgliedrigen Ring erweitert werden. Die bereits in 1.3.2 erwähnte D₁/D₅-selektive Verbindung **SCH 39166** (s. Tab. 1.4) besitzt ein ähnliches Grundgerüst, das in rigidisierter Form vorliegt, und das Stickstoffatom in einer im Vergleich zum **LE 300** und **LE 404** benachbarten Position zeigt. Aufgrund der eindeutig beobachteten Affinitätssteigerung durch Ringspaltung der zentralen C-N-Bindung der Benz[*a*]-indolo[2,3-*h*]chinolizine zu Benz[*d*]indolo[2,3-*g*]azecinen [24] sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß dieser Effekt auch bei der Überführung in noch weniger rigidisierte, elfgliedrige Systeme zu beobachten ist. Gleichzeitig sollte in 5-Stellung der erwünschten Zielstruktur ein isosterischer Austausch einer Methylengruppe gegen ein Sauerstoffatom erfolgen. Ein Vergleich isosterer Apomorphinderivate bezüglich eines CH₂/O-Austausches in der Literatur zeigte eine Überlegenheit der Sauerstoffderivate in Affinität und Selektivität zu Dopamin D₁- und D₂-Rezeptoren. [30] Letztlich sollten diese erwünschten Ringysteme (**9**) als in 3-Stellung methoxylierte und – analog zum **LE 404** - hydroxylierte Verbindungen darge-

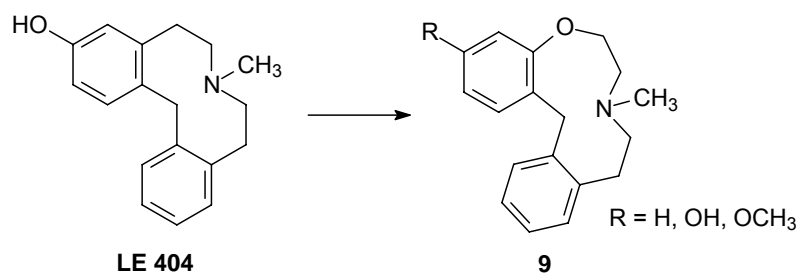


Abb. 1.7: Variationen der Leitstruktur N-Methyl-3-hydroxy-5,6,8,9,14-hexahydrodibenz[d,g]-azecin **LE 404**

stellt werden, um auch hier Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen machen zu können.

Die Bedeutung des Ausmaßes an Rigidisierung der Ringsysteme für ihr pharmakologisches Profil sollte dann noch weiter untersucht werden, in dem offenkettige Analoga der Verbindungen vom Typ **9** synthetisiert und gescreent werden sollten, die einen totalen Verlust der Rigidität zeigen. Zu diesem Zweck sollte eine Reihe verschiedener 2-Benzyl-phenoxyethylaminderivate (**10**) dargestellt werden, Verbindungen vom Typ **9** also, aus denen die C-Atome 9 und 10 "herausgeschnitten" wurden.

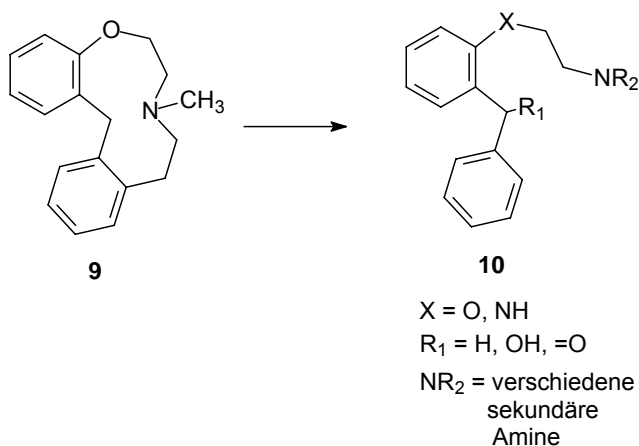
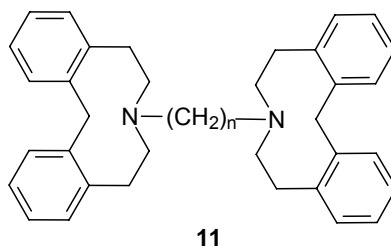


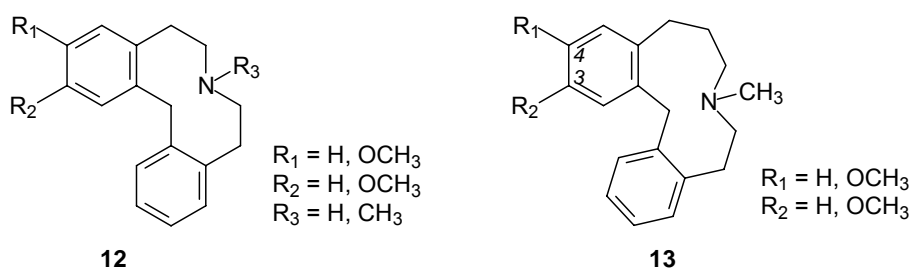
Abb. 1.8: Offenkettige Variationen der Zielstruktur **9**

Als dritte erwünschte Strukturvariation sollten dimere Dibenz[d,g]azecine mit unterschiedlich langen Alkylenspacern (**11**) als potentielle bivalente Liganden an Dopaminrezeptoren dargestellt und gescreent werden (Streng genommen handelt es sich um zwei identische Ligandmoleküle, die über eine Alkylenbrücke miteinander verbunden sind. Trotzdem soll nachfolgend der Einfachheit halber der Begriff "Dimer" verwendet werden). Dieser Ansatz wurde bereits beim **LE 300** verfolgt und führte zu



teilweise hochaffinen Liganden, deren Bindungseigenschaften stark von der Länge der Alkylenspacer abhängen. [29]

In die pharmakologische Evaluation der Substanzen sollten, wie bereits erwähnt, auch andere Substanzen aus dem Arbeitskreis einbezogen werden. Dazu gehören zum einen neuartige Dibenz[*d,g*]azecine (**12**) als auch Dibenz[*d,g*]-2-azacycloundecene (**13**), die ebenfalls interessante Strukturen im Zusammenhang mit den o. a. Fragestellungen bezüglich des Einflusses der Ringgröße, der Rigidisierung und der Substitution in 3-Stellung auf ihre Bindungseigenschaften an Dopamin-Rezeptorsubtypen darstellen. Zusätzlich sollten hier in 3,4- und in 4-Stellung substituierte Verbindungen mit in die Testungen einbezogen.



Das pharmakologische Screening sollte mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien an humanen, klonierten Dopamin-Rezeptorsubtypen erfolgen. Dazu stehen dem Arbeitskreis HEK- und CHO-Zelllinien zur Verfügung, die klonierte, humane Dopaminrezeptoren (D_1 , D_{2L} , D_3 , $D_{4.4}$, D_5) exprimieren. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit, Bindungsaffinitäten direkt und ausschließlich an einzelnen - auch humanen - Rezeptorsubtypen zu ermitteln, wie es mit anderen Methoden (z. B. an Homogenaten von Rattenstriatum) nicht möglich ist.

2 Synthetischer Teil

2.1 Oxa-Homologe der Dibenz[*d,g*]azecine

Wie unter Kap. 1.5 ausgeführt, sollten Oxa-Homologe des sehr aktiven Dopamin-Rezeptorliganden **LE 410**, sowie funktionalisierte Derivate hergestellt werden. Die Synthese dieser Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecene **9** (s. auch Abb. 1.7) soll nachfolgend beschrieben werden.

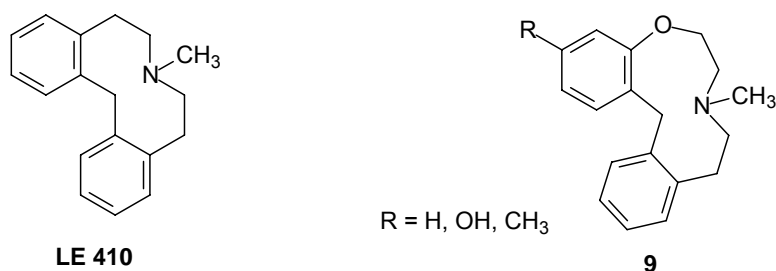


Abb. 2.1: Dopamin-Rezeptorligand **LE 410** und Oxa-Homologe **9**

2.1.1 Literaturbekanntes zur Synthese von Homologen der Dibenz[*d,g*]azecine

Die zehngliedrigen Ringsysteme können über ein schon bei der Synthese des **LE 300** angewandtes Verfahren [24] dargestellt werden. Dabei wird das tertiäre Stickstoffatom von aromatisch annelierten Chinolizinen quarternisiert und die zentrale C-N Bindung im darauffolgenden Schritt unter den Bedingungen einer Birch-Reduktion gespalten. Dies gelang *Witt et al* [24] bei einem Benzindolochinolizin und später *Schweikert* [35] bei Dibenzochinolizinen:

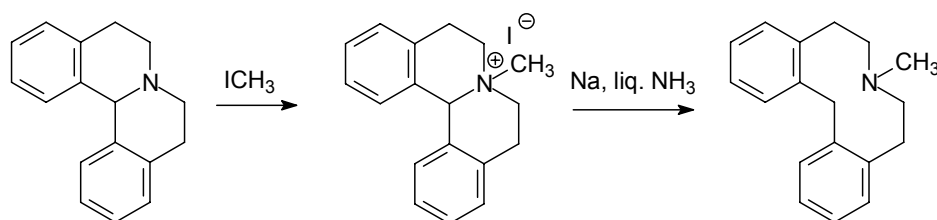


Abb. 2.2: Synthese der Dibenz[*d,g*]azecine aus Dibenz[*a,h*]chinolizinen

Für die Spaltung der zentralen Benzylaminstruktur zu den zehngliedrigen Ringen wurden von *Witt* [31] mehrere Verfahren untersucht, wie etwa die Spaltung von

N-Oxiden, und Spaltungen nach Umsetzung mit Chlorameisensäurealkylestern und Bromcyan. Das oben dargestellte Verfahren erwies sich dabei als optimal hinsichtlich eines selektiven Reaktionsverlaufes und einer hohen Reinheit und Ausbeute der Produkte.

Bezüglich der Synthese der Dibenz[*a,h*]chinolizine finden sich in der Literatur mehrere Verfahren. *Meise und Müller* [32] gelang die Darstellung erstmals in zwei Stufen durch Aminolyse von Isochroman-1-on mit 2-Phenylethylaminen zu (2-Hydroxyethyl)-benzamid ("Hydroxyamidweg"), anschließendem Bischler-Napieralsky-Ringschluß und einer reduktiven Zyklisierung im letzten Schritt (s. Abb. 2.3). Bei der Synthese der in 2-, 3-, 11- und 12-Stellung substituierten Chinolizine erreichten sie höhere Ausbeuten als in zuvor publizierten Verfahren, lediglich das in 3-Stellung unsubstituierte Hydroxyamid ließ sich nicht zum Chinolizin zyklisieren.

Hydroxyamidweg:

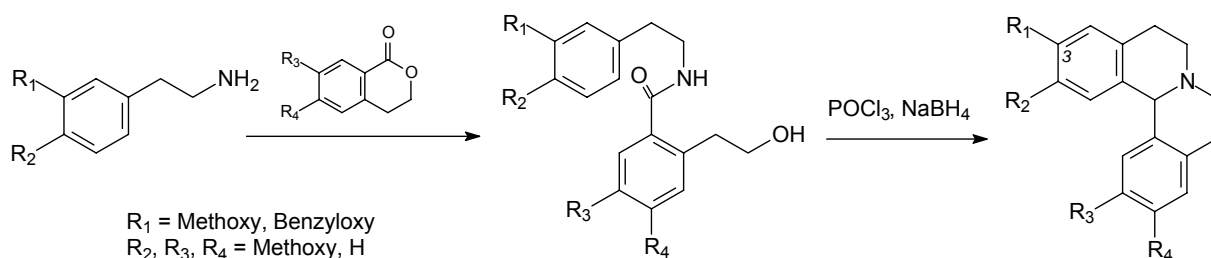


Abb. 2.3: Synthese von Dibenz[*a,h*]chinolizinen nach [32]

Van Binst und Baert [33], sowie *Vlaeminck et al* [34] wählten andere Routen zur Synthese der Dibenz[*a,h*]chinolizine, die *Schweikert* [35] später kombinierte, modifizierte und so einfacher über den "Nitrilweg" zu den gewünschten Verbindungen gelang.

Van Binst und Baert [33] beschreiben die Bildung von 3,4-Dihydro-1-phenylisochinolin ausgehend von Benzonitril und 2-Phenylethylchlorid unter Komplexierung mit Zinntetrachlorid. Anschließend erfolgte die Hydrierung zum 1,2,3,4-Tetrahydro-1-phenylisochinolin.

Vlaeminck et al [34] beschreiben nun die Hydroxyethylierung dieses Tetrahydro-1-phenylisochinolins an der sekundären Aminfunktion und führen schließlich den Ringschluß durch Erhitzen in Polyphosphorsäure durch. *Schweikert* [35] führte die Hydroxyethylkette ein durch Quarternisierung des Dihydro-1-phenylisochinolins an der zyklischen Iminfunktion mit 2-Bromoethanol und anschließender Reduktion mit

Natriumborhydrid. So konnte der Einsatz des schlecht zu dosierenden Ethylenoxids, wie bei [34] beschrieben, vermieden und die Ausbeute erhöht werden. Im Gegensatz zum *Hydroxyamidweg* waren mit dieser Methode auch gänzlich unsubstituierte Dibenz[*a,h*]chinolizine zugänglich geworden.

Nitrilweg:

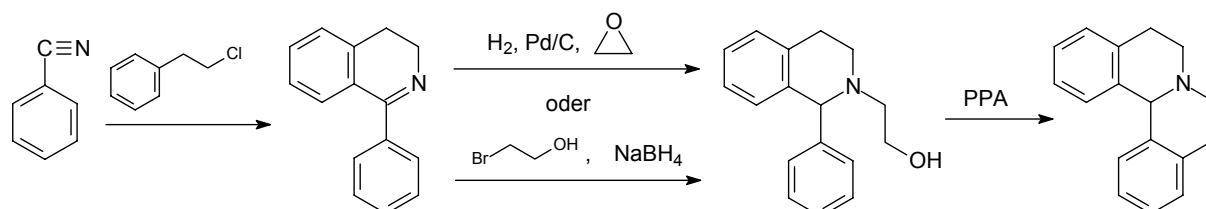


Abb. 2.4: Synthese von Dibenz[*a,h*]chinolizinen, modifiziert nach [35]

Meise und Mitarbeiter [36–38] synthetisierten Derivate des Isochino[1,2-*a*][2]benzazepin-Gerüsts, einem homologen Dibenz[*a,h*]chinolizin, bei dem der Ring B um ein C-Atom erweitert ist, über den *Hydroxyamidweg*.

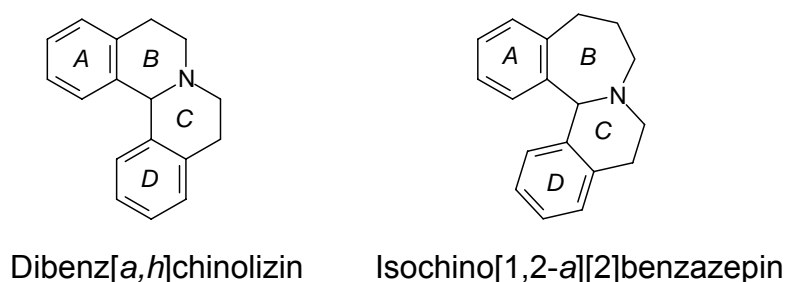


Abb. 2.5: Homologe Chinolizine

Im Gegensatz zum oben beschriebenen Verfahren (s. Abb. 2.3) führte die Umsetzung der (2-Hydroxy-)benzamide **16** (s. Abb. 2.6) mit POCl_3 jedoch nicht zur erwünschten Bischler-Napieralsky-Zyklisierung, sondern zu Imidlactonen.[39] Der Ringschluß gelang erst nach Veresterung der Hydroxygruppe mit Chlorameisensäureethylester zum geschützten Amid **17**. Verseifung des Kohlensäureesters, Austausch der Hydroxygruppe gegen Chlor und eine nachfolgende reduktive Zyklisierung lieferten das Isochino[1,2-*a*][2]benzazepin **18** in einem vierstufigen "Eintopfverfahren" ohne Aufarbeitung der Zwischenprodukte.

Die durch Aminolyse unsubstituierter Phenylpropylamine gewonnenen Benzamide **16** ($\text{R}_1 - \text{R}_4 = \text{H}$), die also in 3-Stellung keine den Aromaten aktivierenden Substituenten

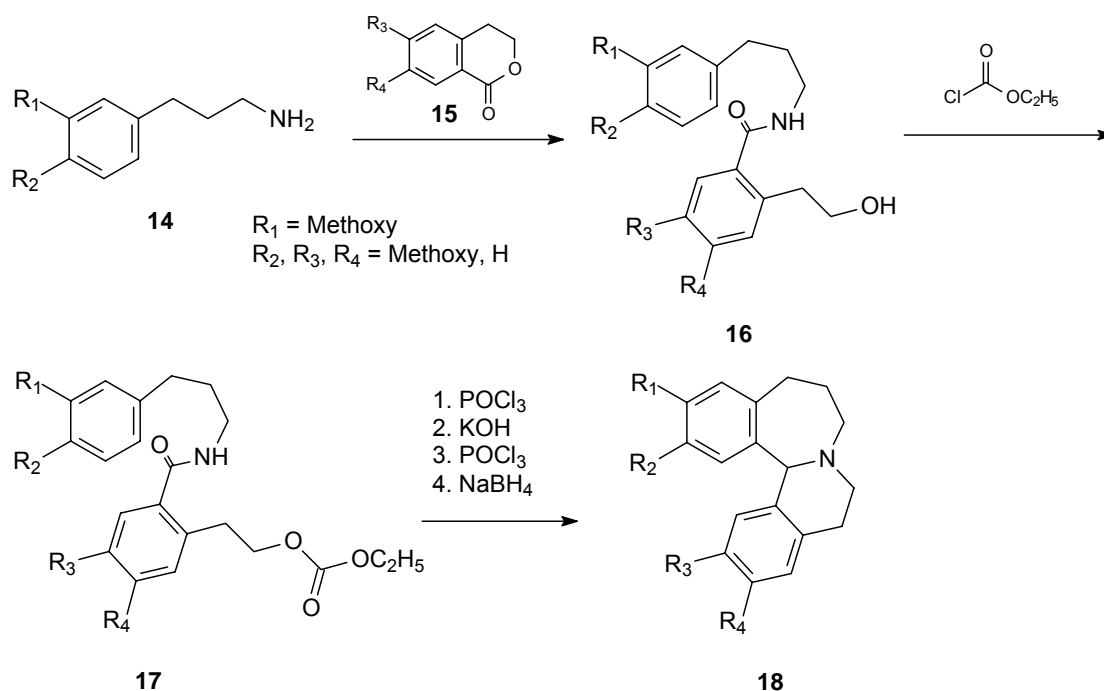


Abb. 2.6: Synthese von Isochino[1,2-a][2]benzazepinen, modifiziert nach [38]

tragen, ließen sich jedoch auch mit diesem Verfahren nicht zyklisieren.

Zur Synthese der für die Darstellung oxa-homologer Chinolizine benötigten Phenoxyethylamine finden sich in der Literatur neben den Standardverfahren zur Darstellung primärer Amine, wie z. B. der Gabrielsynthese, spezielle Synthesewege wie der von *Su und Speranza* beschriebene [40]. Sie nutzen die Eigenschaft von 2-Alkyl-2-oxazolinen, in Abwesenheit von Wasser mit Phenolen Ether zu bilden, und setzen Phenol und 2-Methyl-2-oxazolin ohne Lösungsmittel unter Erhitzen zum *N*-[1-(2-phenoxyethyl)]-acetamid um. Dieses konnten sie zum Phenoxyethylamin hydrolysieren, ohne die Etherbrücke zu spalten und unerwünschte Substitutionen am Aromaten herbeizuführen, indem sie nicht Salz- oder Schwefelsäure, sondern 85 %ige Phosphorsäure einsetzten.

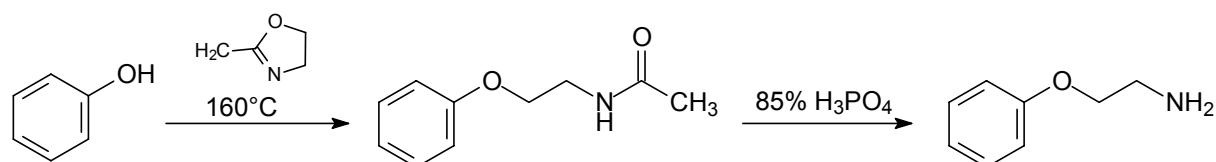


Abb. 2.7: Phenoxyethylaminsynthese nach *Su und Speranza* [40]

Neben *Meise und Mitarbeitern* beschreibt noch *Gschwend* [41] in einem Patent Isochino[1,2-a][2]-benzazepin-Derivate mit wechselnden, meist komplexen Substitu-

tionsmustern an den aromatischen Ringen und den Methylengruppen. Alle hier aufgeführten Verbindungen sind in 2-Stellung am Benzenring substituiert. Die Synthese dieser Heterocyclen wird im Patent allerdings nicht beschrieben.

In der Literatur finden sich keine weiteren Methoden zur Synthese unsubstituierter Isochino-[1,2-*a*][2]benzazepine. Offensichtlich ist für die C-C-Knüpfung durch Bischler-Napieralsky-Ringschluß zur Benzazepin-Teilstruktur eine den Aromaten aktivierende Substitution in 3-Stellung am ankondensierten Benzenring essentiell (s. Abb. 2.6).

Bremner et al [42] gelang jedoch die Synthese des am Benzenring nicht substituierten 5-Phenyl-2,3-dihydro-, bzw. 2,3,4,5-Tetrahydro-1,4-benzoxazepins, das als Vorstufe für die Synthese nicht substituierter Isochino-[2,1-*d*][1,4]benzoxazepine über den *Nitrilweg* dienen könnte (s. Abb. 2.10). Sie waren mit einem Ringschluß durch eine C-N-Verknüpfung erfolgreich. Hierbei zyklisierten sie [2-(2-Aminoethoxy)]-benzophenon (**19**) durch Erhitzen in Pyridin zum zyklischen Imin **20**. Das Aminobenzophenon **19** erhielten sie in vier Stufen, ausgehend vom Natriumsalz des 2-Hydroxybenzophenons durch Umwandlung zum Cyanoethyl-derivat des Phenols und Reduktion zum Amin, wobei die Ketogruppe geschützt werden mußte.

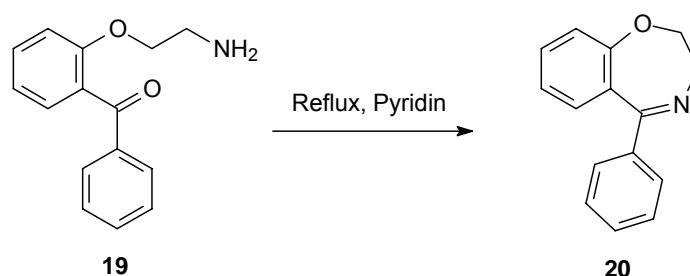


Abb. 2.8: C-N-Ringknüpfung zum 5-Phenyl-1,4-benzoxazepin-Ringsystem

Smith und Mitarbeiter [43] gelangen in nur zwei Stufen zu analogen (2-Aminoethoxy)benzenen, indem sie Phenol und (2-Hydroxyethyl)-phtalimid nach *Mitsunobu* [53] veretherten und das Phtalimid mit Phenylhydrazin in das primäre Amin überführten. Übertragen auf die Synthese von **19** wäre angesichts der Ketofunktion eine Spaltung mit einem Hydrazin sicher ungeeignet.

2.1.2 Syntheseplanung

Aufgrund der aus der Literatur und im Arbeitskreis gewonnenen Erkenntnisse erschien es sinnvoll, zunächst Isostere der Isochino[1,2-*a*][2]benzazepine mit einem Sauerstoffatom in 10-Stellung darzustellen, die dann – nach Quarternisierung mit Methyljodid - unter den Bedingungen einer Birch-Reduktion in elfgliedrige Dibenz[*g*,*j*]-1-oxa-4-azacycloundecene überführt werden könnten. Die zentrale, sowohl zum Sieben-, als auch zum Sechsering gehörige C-N-Bindung würde dabei im Sinne einer Ringerweiterung analog der Azecinsynthese gespalten (s. Abb. 2.1).

Die Ergebnisse von *Meise et al* [36–38] und *Bremner et al* [42] (s. auch Kap. 2.1.1) legen nahe, die tetrazyklischen Ringsysteme nur im Falle von Derivaten, die einen aktivierenden Substituenten in 3-Stellung tragen, über eine Bischler-Napieralsky-Reaktion als Teilschritt zum Oxazepin-Ringschluß darzustellen. In diesem Falle könnte ausgehend von 3-substituierten Phenoxyethylaminen analog *Meise und Schlüter* [36] vorgegangen werden, um zu den entsprechenden Isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepinen zu gelangen. Die Phenoxyethylamine könnten mit Hilfe der Methode von *Su und Speranza* [40] erhalten werden (s. Abb. 2.9).

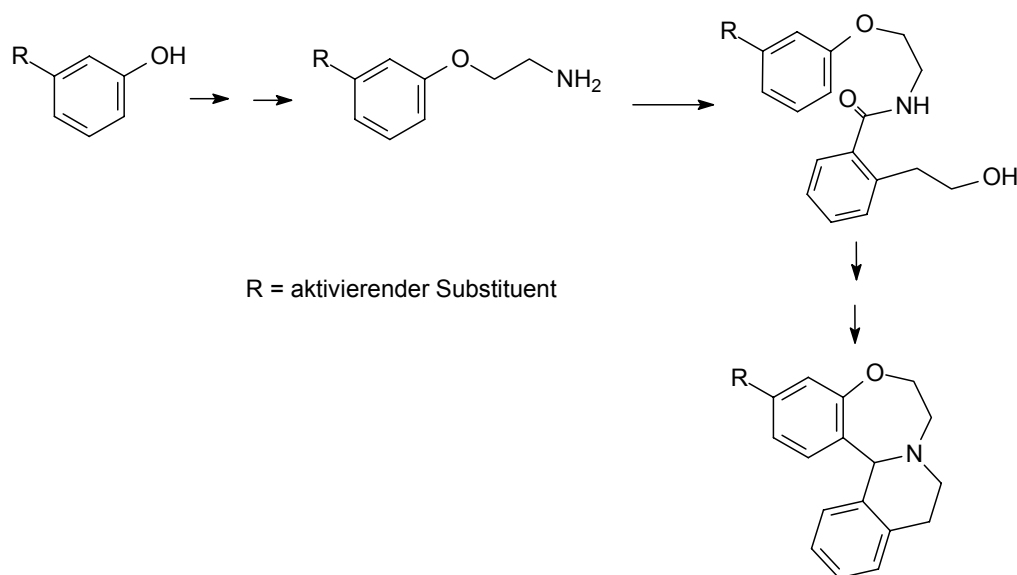


Abb. 2.9: Schema der geplanten Synthese substituierter Isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepine

Die Synthese eines unsubstituierten Analogons sollte aus o.a. Gründen über eine C-N-Ringknüpfung zur Benzoxazepin-Teilstruktur erfolgen, wie sie bei *Bremner et al* [42] beschrieben ist. Dabei sollte das durch *Mitsunobu*-Veretherung gewonnene Ami-

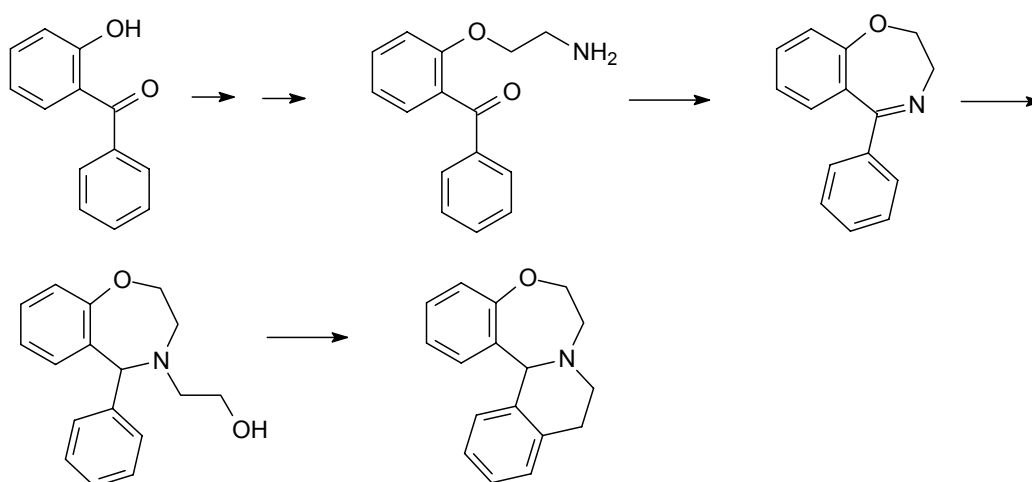


Abb. 2.10: Schema der geplanten Synthese unsubstituierter Isochino[2,1-d][1,4]benzoxazepine

nobenzophenon zunächst in das 1,4-Benzoxazepin umgewandelt werden, und der letzte Zyklisierungsschritt über einen modifizierten *Nitrilweg* erfolgen, also durch Reduktion und Hydroxyethylierung der Aminfunktion und anschließenden Ringschluß mit Polyphosphorsäure (s. Abb. 2.10).

2.1.3 Versuch der Synthese von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydro-dibenz[g,]-1-oxa-4-azacycloundecen über 5-Phenyl-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin

Der Versuch zur Synthese von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydro-dibenz[g,]-1-oxa-4-azacycloundecen (**24**) erfolgte entsprechend Abbildung 2.11.

Das 2-(2-Aminoethoxy-)benzophenon **19** wurde durch eine *Mitsunobu*-Veretherung von 2-Benzoylphenol mit 2-Hydroxyethylphthalimid nach *Smith und Mitarbeitern* [43] und anschließender Hydrolyse mit konz. HCl in siedendem Dioxan dargestellt. Abweichend von *Smith et al* [43] wurde Diisopropylazodicarboxylat statt Diethylazodicarboxylat als Reagenz für die *Mitsunobu*-Reaktion verwendet, da letzteres als potentieller Sprengstoff nicht mehr im Handel ist. Das Diisopropylderivat wurde deshalb auch bei allen anderen Reaktionen dieser Art in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Reaktionszeit für die Phthalimid-Hydrolyse wurde abweichend von *Smith et al* [43] von 48h für das in 2-Stellung unsubstituierte Benzophenon-derivat auf 96h verlängert, wodurch sich die Ausbeute an **19** auf 77% erhöhte (s. Abb. 2.11).

Der Ringschluß zu **20** erfolgte dann nach *Bremner et al* [42] durch einfaches Erhitzen, allerdings – abweichend von der Literaturvorschrift – in Toluol statt Pyridin. Dies hatte keinen Einfluß auf Ausbeute, Reaktionszeit und Reinheit des Produktes.

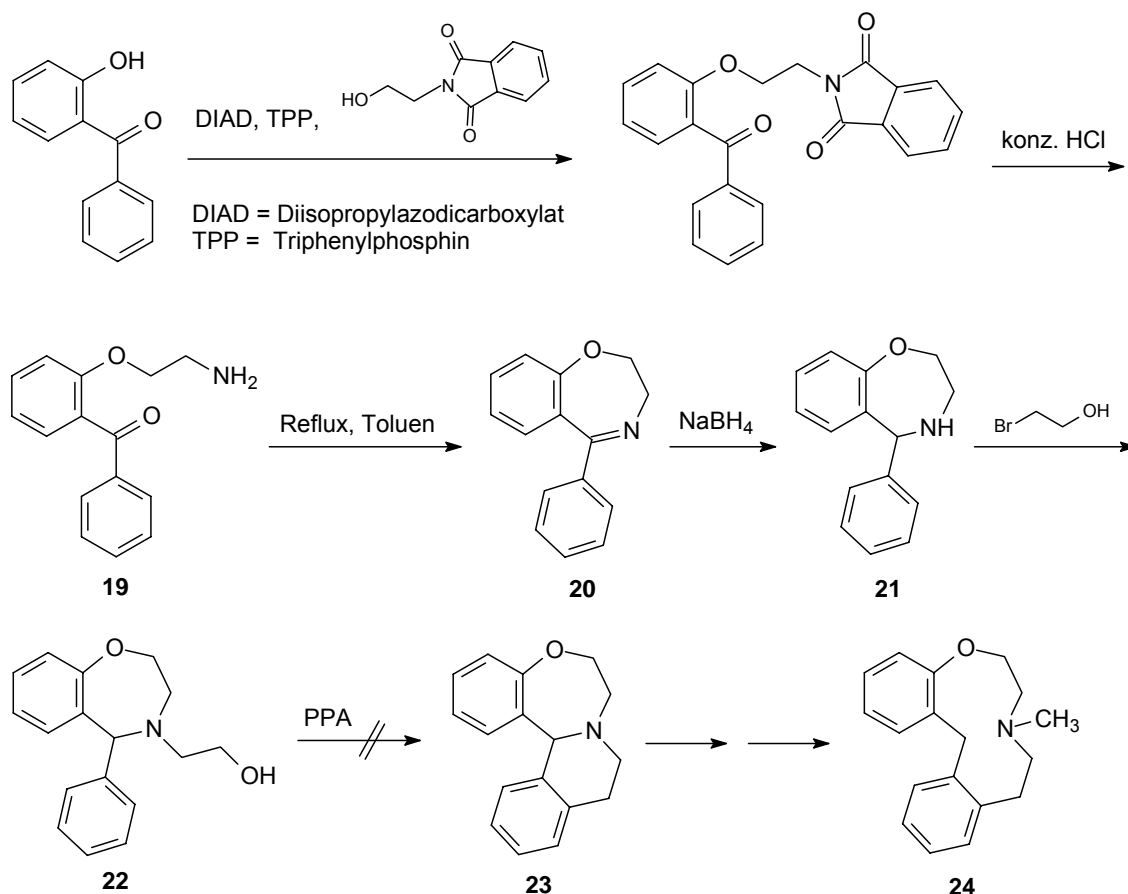


Abb. 2.11: Versuch zur Synthese des unsubstituierten Dibenz[g,j]1-oxa-4-azacycloundecens **24** über das 5-Phenyl-2,3-dihydro-1,4-Benzoxazepin

Wie in der Literatur beschrieben, wurde ein blaß gelblich-grünes Öl isoliert, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Die säulenchromatographische Isolierung des primären Amins **19** als Vorstufe der Ringschlußreaktion erwies sich als nicht nötig und wurde nur zur Charakterisierung des Produktes durchgeführt. Dünnschichtchromatographisch wurde eine einzige Verunreinigung detektiert, die - entsprechend der Literatur - in einer GC/MS-Untersuchung bereits als das Folgeprodukt **20** identifiziert werden konnte. Durch die Kombination der Methoden von *Smith* [43] und *Bremner* [42] war es also möglich, in einem neuen Syntheseweg das 5-Phenyl-1,4-benzoxazepingerüst in nur drei Stufen zu synthetisieren.

Im NMR-Spektrum von **20** fällt eine deutliche Tieffeldverschiebung des Signals der der Etherfunktion benachbarten Methylengruppe im Siebenring um 0,4 ppm gegenüber der offenkettigen Vorstufe auf. Es erscheint hier bei 4.64 ppm als Triplet.

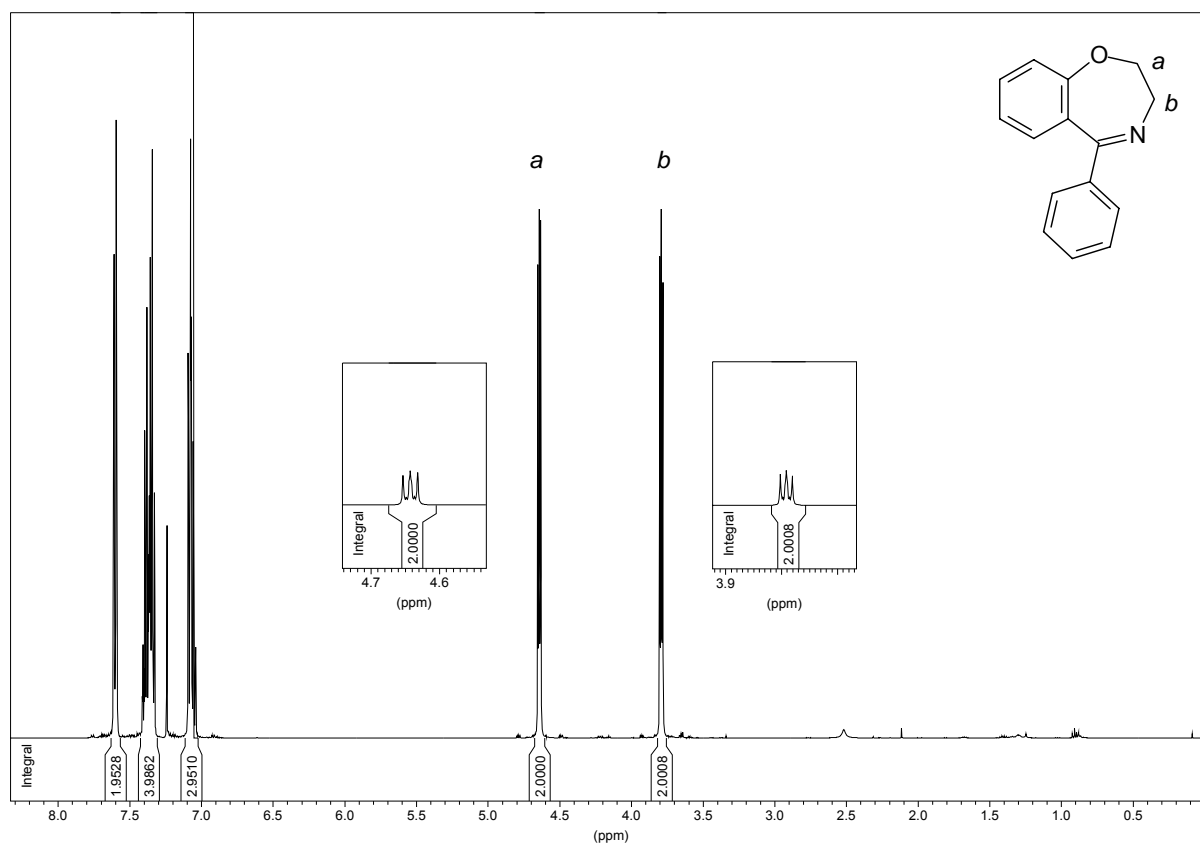


Abb. 2.12: ^1H -NMR – Spektrum von **20**

Die weitere Synthese zum tetrazyklischen Isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepin sollte über eine Quarternisierung des Imin-Stickstoffs in **20** mit 2-Bromoethanol und anschließender Reduktion des quartären Stickstoffs zum hydroxyethylierten Derivat **22** erfolgen. *Bremner* [42] gelang eine Quarternisierung von **20** mit Methyljodid im

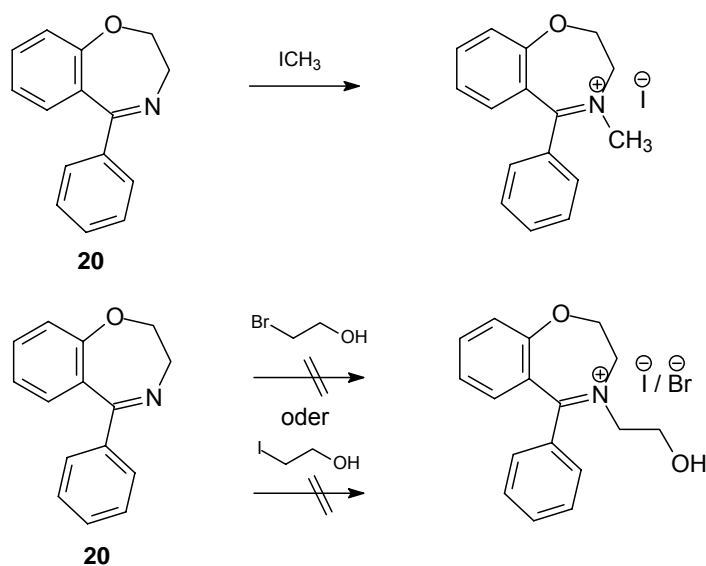


Abb. 2.13: Quarternisierungsversuche des Imin-Stickstoffs in **20**

Bombenrohr in siedendem 2-Butanon bei einer Reaktionszeit von 10 h. Während dieses Ergebnis reproduziert werden konnte, erfolgte beim Einsatz von 2- Bromo- bzw. 2-Iodoethanol unter gleichen Reaktionsbedingungen keine Umsetzung zum gewünschten Produkt, vielmehr wurden bei der Aufarbeitung auch nach wiederholten Versuchen und längerer Reaktionsdauer (bis zu 24 h) neben Zersetzungsprodukten die Edukte isoliert.

Es wurde dann versucht, zunächst das zyklische Imin mit Natriumborhydrid zum sekundären Amin **21** zu reduzieren und dieses dann mit Halogenethanol zum 2-Hydroxyethylaminderivat **22** umzusetzen. Die Reduktion gelang glatt in Ethanol unter Eiskühlung und in hoher Ausbeute (84%).

Das NMR-Spektrum des Tetrahydro-benzoxazepins **21** (s. Abb. 2.14) zeigt ein Singulett bei 5,2 ppm für das Methinproton am neu entstandenen chiralen Zentrum am C-5 Atom. Weiter ist eine deutlich komplexere Aufspaltung der Signale im Aliphatenbereich zwischen 3,2 und 4,3 ppm als bei der Dihydro-Vorstufe **20** zu erkennen. Die Methylengruppen des Siebenringes sind nach Einführung des chiralen Zentrums nicht mehr chemisch äquivalent und koppeln zusätzlich vicinal und geminal. Die Methylenprotonen am C-2 Atom neben der Etherbindung sind sogar als zwei voneinander getrennte Signale erkennbar.

Die Substitution am Stickstoff mit 2-Bromoethanol gelang durch Refluxieren in wasserfreiem, hochsiedendem Lösungsmittel (Toluen) unter Zusatz einer Hilfsbase (Kaliumcarbonat) bei einer Reaktionszeit von 16 – 18 Stunden. Die Ausbeute lag hier bei 68%. Die Identität und Reinheit des Produktes konnte sowohl durch NMR- als auch durch GC/MS - Daten nachgewiesen werden. Das (5-Phenyl-1,4-benzoxazepin-4-yl)ethanol **22** sollte nun, wieder dem Reaktionsweg von *Schweikert* [35] folgend, mit Polyphosphorsäure zum tetrazyklischen Ringsystem zyklisiert werden, was aber leider nicht gelang. Beim Erhitzen mit Polyphosphorsäure fand vielmehr eine weitgehende Zersetzung des Eduktes statt. Aus den Zersetzungsprodukten konnte eine geringe Menge eines Feststoffes isoliert werden, dessen Struktur nicht aufgeklärt werden konnte. Im NMR-Spektrum dieser Substanz findet sich jedoch kein Methin-Signal, das für das Isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepin **23** (Position 14b) zu erwarten wäre. Das ¹H-NMR-Spektrum des von *Schlüter* [44] dargestellten, 3-Methoxy-substituierten, isosteren Isochino[1,2-*a*][2]benzazepins **18**, (Abb. 2.6) zeigt dieses Signal als Singulett bei 5,15 ppm. Somit war die weitere Umsetzung zum Dibenz[*g,j*]1-oxa-4-azacycloundecen **24** auf diesem Wege nicht möglich.

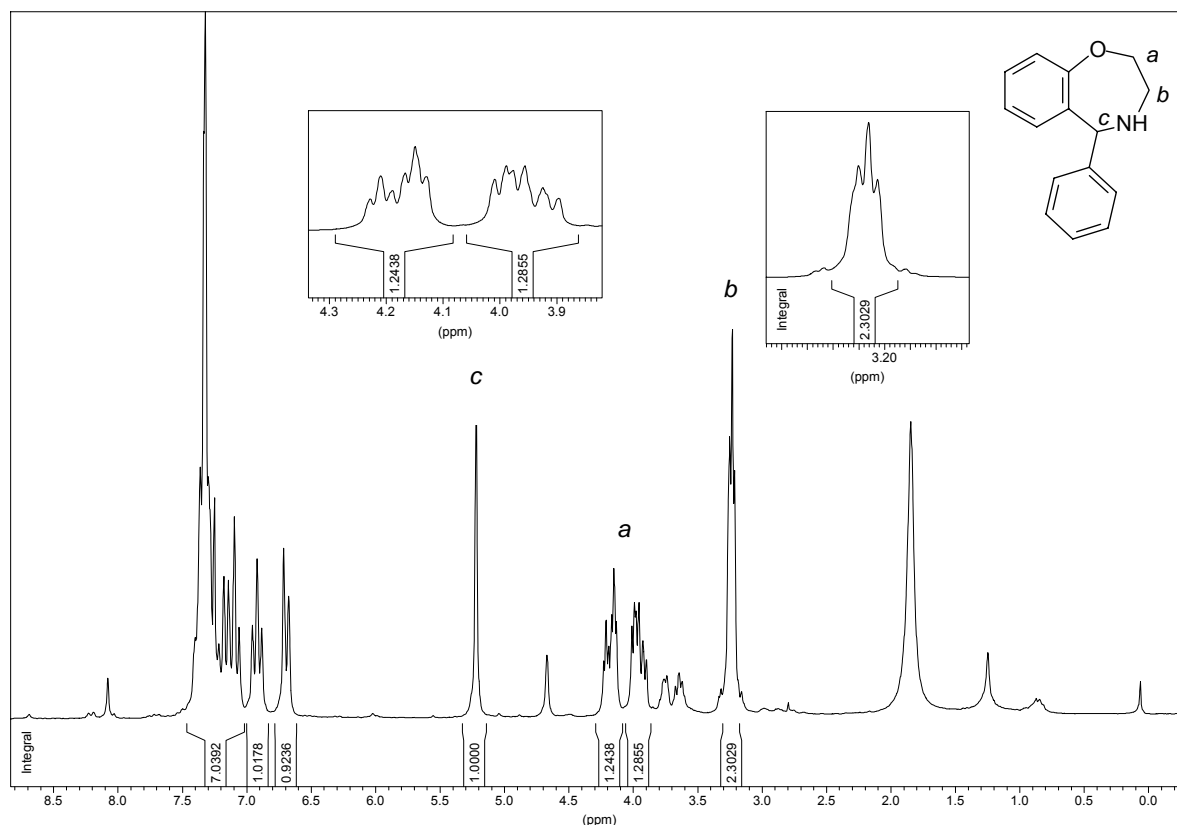


Abb. 2.14: NMR-Spektrum von **21** (verunreinigt mit Wasser [1,85 ppm] und Edukt (**20**) [3,8 und 4,65 ppm])

2.1.4 Synthese des 3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecens

Die Synthese des elfgliedrigen, 3-methoxylierten Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecens erfolgte im Sinne einer Ringerweiterung durch reduktive Ringspaltung der Benzylaminstruktur im zuvor am Stickstoff quarter-nisierten Isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepin **32** nach der Methode von *Witt* [24] (s. Abb. 2.2 und 2.9). **31** stellt ein oxa-homologes Chinolizin mit einem Sauerstoffatom statt einer Methylengruppe in Position 5 dar und wurde, wie in Kap. 2.1.1 und 2.1.2 erläutert, nach dem Verfahren von *Meise und Schlüter* [36] dargestellt (Abb. 2.15). Das Phenoxyethylamin **25** wurde nach *Su und Speranza* [40] durch gemeinsames Erhitzen von 3-Methoxyphenol und 2-Methyl-2-oxazolin bei 180°C über das resultierende Acetamid und dessen anschließender Hydrolyse mit 85%iger Phosphorsäure gewonnen (s. Abb. 2.7). Im Unterschied zum in der Literatur beschriebenen, am Aromaten unsubstituierten Produkt, das als Feststoff anfällt, entsteht beim 3-Methoxyderivat des Acetamid-Intermediats ein braunes Öl, das durch Vakuumdestillation gereinigt werden kann.

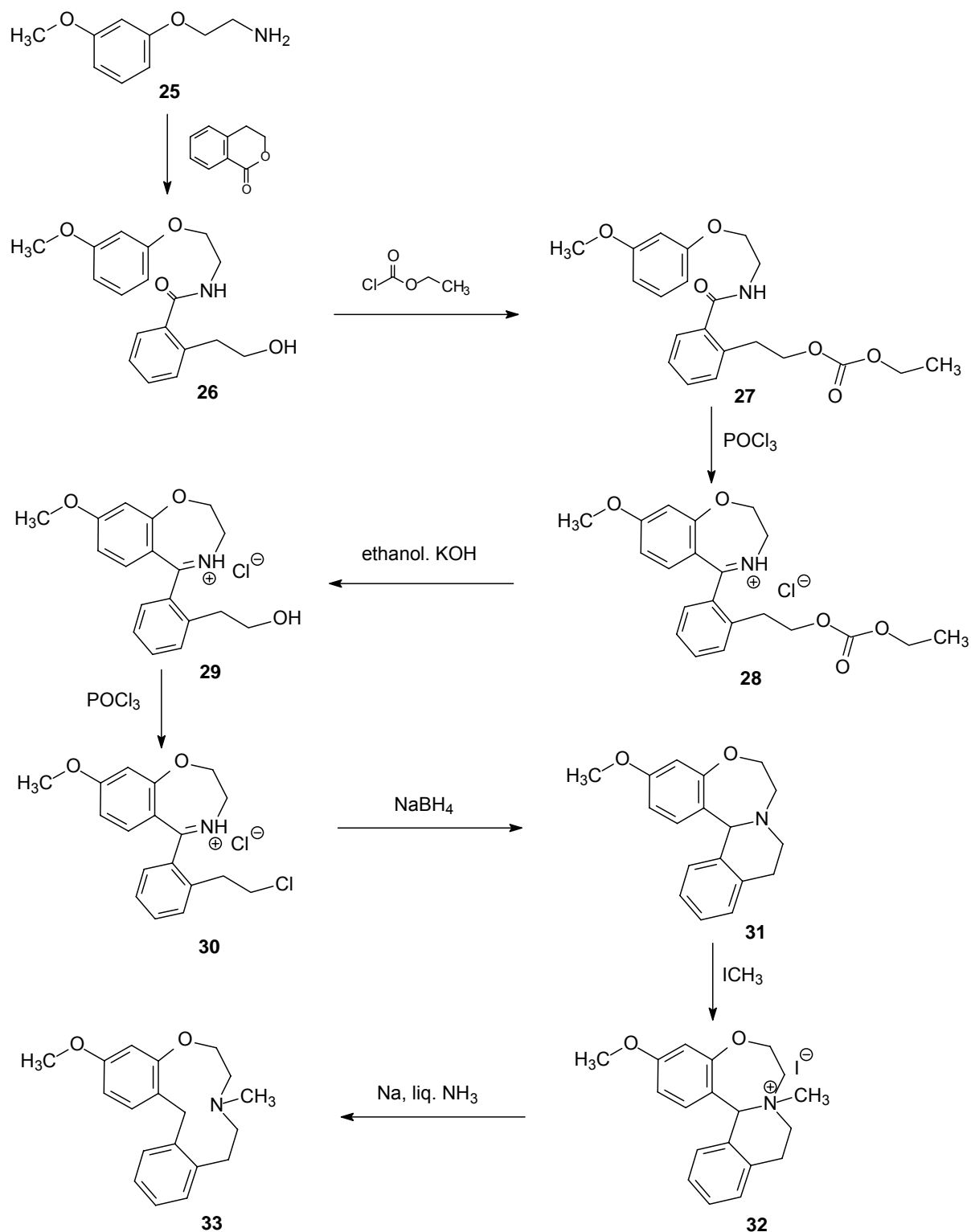
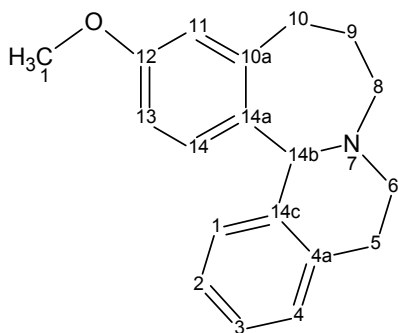


Abb. 2.15: Synthese von 3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecen (**33**)

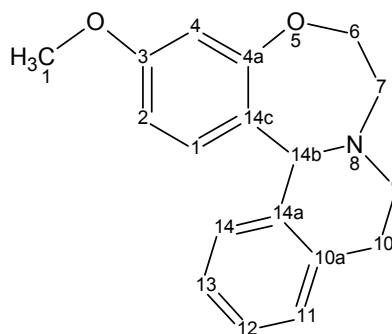
Das nach der Hydrolyse entstandene primäre Amin fiel ebenfalls als bräunliches Öl an, das durch Fällung als Hydrochlorid in etherischer HCl -Lösung gereinigt werden konnte. Die Gesamtausbeute war mit 34% sehr viel geringer als für das unsub-

stituierte Derivat (98%). Immerhin kann **25** durch Extraktion mit Toluol ohne weitere Reinigung elementaranalytisch rein erhalten werden. **25** wurde nun zur Synthese des tetrazyklischen Isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepins **31** analog der Methode für die Synthese der Isochino[1,2-*a*][2]benzazepine von *Meise und Schlüter* [36, 38] (s. Abb. 2.6 und 2.15) eingesetzt.

Angemerkt sei noch, daß *Meise und Schlüter* [36, 38] bei der Synthese der Isochino[1,2-*a*][2]benzazepine die Reaktionsschritte vom offenkettigen Phenylpropylamin bis zum Homo-chinolizin, sowohl mit, als auch ohne Isolierung der Zwischenstufen durchführten. Dieses Vorgehen ließ sich auf die Überführung eines Oxa-Homologs der Benzamide **26** in das entsprechende Isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepin **31** übertragen. Die Zielverbindung **31** trägt also in Position 5 (entsprechend Position 10 des Homochinolizins) ein Sauerstoffatom (s. Abb. 2.16).



12-Methoxy-5,6,8,9,10,14*b*-hexahydro-
isochino[1,2-*a*][2]benzazepin



3-Methoxy-6,7,10,14*b*-tetrahydro-9*H*-
isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepin

Abb. 2.16: Isostere homologe Chinolizine

Das Benzamid **26** wurde durch Aminolyse von Isochroman-1-on mit 3-Methoxyphenoxyethylamin gewonnen, wobei eine Ausbeute von 22% nicht überschritten werden konnte, während *Meise und Schlüter* [36] eine Ausbeute von 61% für das entsprechende 3-Phenylpropyl-benzamid beschreiben. Das Isochroman-1-on wurde nach der Methode von *Klinkhammer* [45] durch Oxidation von Isochroman mit Kaliumpermanganat hergestellt.

Das ^1H -NMR-Spektrum von **26** zeigt die der Amidfunktion benachbarten Methylengruppen als Multipletts, die durch die Tieffeldverschiebung der CH_2 -Signale neben der Etherbrücke im Vergleich zur Phenylpropylverbindung zusammenfallen. Alle anderen Signale entsprechen hinsichtlich des Aufspaltungsmusters und der

chemischen Verschiebungen der von *Meise und Schlüter* [36] beschriebenen isosteren Verbindung **16** (s. Abb. 2.6). Im Folgenden wurde das 2-Hydroxyethylbenzamid **26** an der Hydroxylgruppe durch Umsetzung mit Chlorameisensäureethylester geschützt, um die Bildung von Imidlactonen zu vermeiden (s. auch Kap. 2.1.1 und [39]).

26 konnte nahezu quantitativ in den Kohlensäureester **27** übergeführt werden. Die anschließende Darstellung des Isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepins **31** durch *Bischler-Napieralsky*-Zyklisierung, Hydrolyse des Kohlensäureesters, Austausch der Hydroxylfunktion gegen Chlor und reduktiver Zyklisierung zum tetrazyklischen Ringssystem gelang in einer Gesamtausbeute von 23%. Die Synthese der Isochino[1,2-*a*][2]benzazepine gelang laut Literatur [38] mit einer Ausbeute von ca. 60%. Vor dieser "Eintopfreaktion" wurden die einzelnen Zwischenprodukte zu ihrer Charakterisierung isoliert. Während die Isochino[1,2-*a*][2]benzazepine wegen ihrer öligen Konsistenz zu Analysezwecken in die Pikrate oder Perchlorate übergeführt wurden, wurde das hier beschriebene Oxa-Homolog **31** mit Methyljodid am Stickstoff quarternisiert, charakterisiert und dann der anschließenden *Birch*-Reaktion zur Ringerweiterung zugeführt. Die Quarternisierung stellte dabei auch einen Reinigungsschritt dar. Bei der Isolierung der einzelnen Zwischenstufen wurde deutlich, daß die geringeren Ausbeuten bei der Darstellung der Oxa-Homologe auf die Zyklisierung zum Siebenring und das anschließende Entfernen der Schutzgruppe zurückgehen. Beide Umsetzungen lieferten jeweils etwa 20% weniger Produkt im Vergleich zur Synthese der Phenylpropylderivate. Der Austausch der Hydroxygruppe gegen Chlor nach Entschützen des Benzoxazepins **28** verlief mit einer in diesem Vergleich hohen Ausbeute von 80%.

Im ^1H -NMR-Spektrum des geschützten Benzoxazepins **28** sind die Signale der Methylengruppe neben der Etherbrücke nach der Zyklisierung tieffeldverschoben bei 4,7 ppm zu finden, gegenüber 4,0 ppm bei der Ausgangsverbindung **27**. Dieser Effekt konnte auch schon bei dem durch C-N Knüpfung zyklisierten 5-Phenyl-benzoxazepin **20** beobachtet werden (s. Kap. 2.1.3). Auffällig in den Spektren der als Hydrochlorid vorliegenden Verbindungen **28** - **30** ist weiterhin die nahezu vollkommen

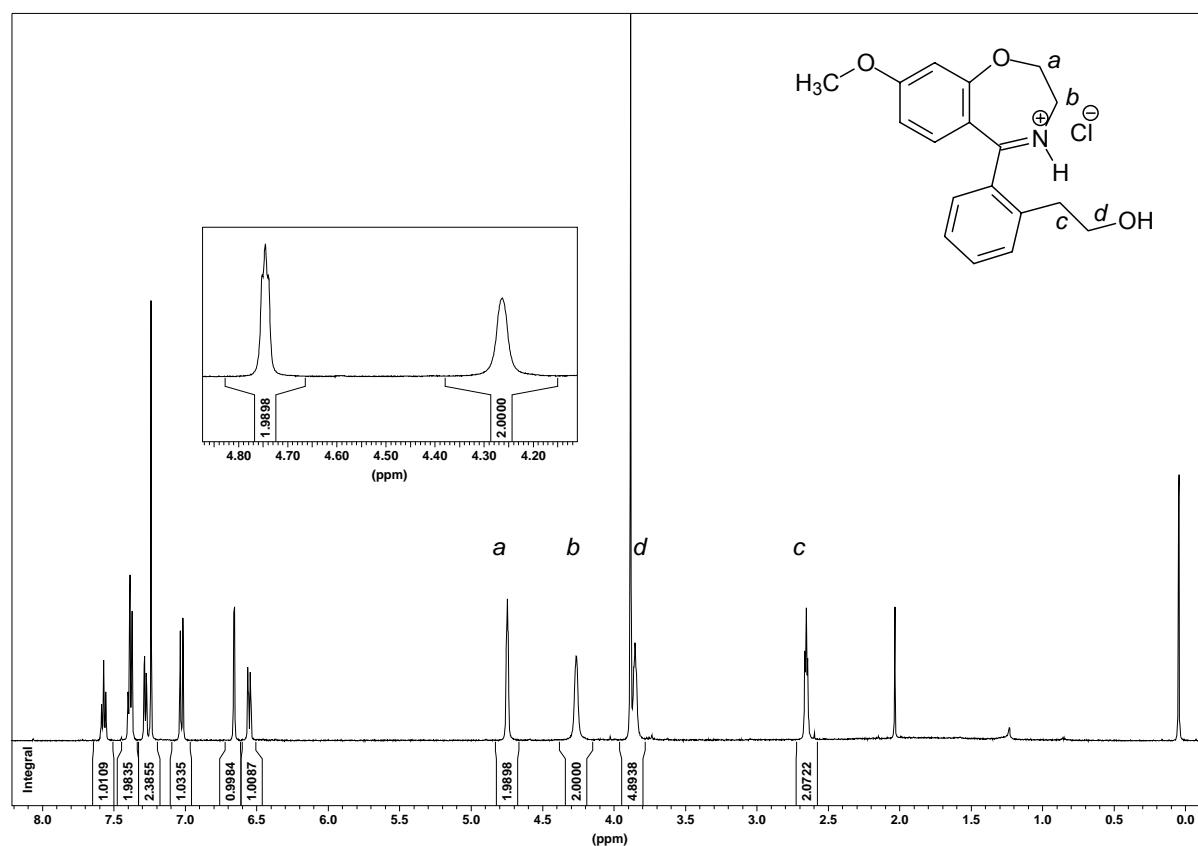


Abb. 2.17: ^1H -NMR-Spektrum von 2-[2-(8-Methoxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)]-ethanol Hydrochlorid (**29**), (verunreinigt mit Wasser [2,0 ppm])

fehlende Aufspaltung der Signale des aliphatischen Bereichs im Benzoxazepinring, die jeweils zwischen 4,1 und 4,8 ppm zu finden sind, obwohl die Spektren bei einer Feldstärke von 500 MHz aufgenommen wurden. Dies dürfte auf eine nicht vollständige Protonierung des Azepin-Stickstoffs zurückzuführen sein.

Der zweite Ringschluß des 2-Chloroethyl-phenylbenzoxazepins **30** erfolgt spontan nach Reduktion des zyklischen Imins mit Natriumborhydrid und lieferte **31** als ein leuchtend gelbes Öl, das ohne weitere Aufreinigung mit Methyljodid quarternisiert wurde, was relativ drastische Bedingungen erforderte.

Während die Methiodide der Dibenz[*a,h*]chinolizine schon bei Raumtemperatur nach 18 h aus wasserfreiem Aceton (Sdp.: 56°C) auskristallisieren, wurde bei den Oxa-Homologen eine Präzipitation des Methiodides **32** erst nach längerem Rühren in siedendem Toluol (Sdp.: 111°C) erreicht. Alkylierungsversuche in dipolaren, aprotischen Lösungsmitteln, wie z. B. Acetonitril oder Nitromethan, wie sie von Lehrbüchern (z. B. *Organikum* [46]) vorgeschlagen werden, schlugen fehl.

Die Ringerweiterung des Tetrazyklus **32** zum elfgliedrigen Trizyklus **33** erfolgte unter den Bedingungen einer *Birch*-Reduktion, prinzipiell nach der von *Witt* [31] für die

Ringöffnung sechskerniger Chinolizine entwickelten Methode (s. Kap. 2.1.1), wie sie auch von anderen Mitgliedern des Arbeitskreises angewandt wurde, beispielsweise für die Darstellung der Dibenz[*d,g*]azecine von *Schweikert* [35]. Beide führten die Reaktion in flüssigem Ammoniak unter Zugabe kleiner Portionen elementarem Natriums durch, wodurch im Reaktionsansatz solvatisierte Elektronen entstehen (blaue Farbe!), die das eigentliche Reduktions-Agens darstellen. Die Reaktion kann dann durch Zugabe von Ammoniumchloridlösung abgebrochen werden, da die Elektronen sofort abgefangen werden. Zur Steuerung der Reaktion lassen sich mehrere Parameter ändern: Zum einen können andere, mehr oder weniger reaktive Alkalimetalle als Natrium (z. B. Lithium, Kalium) eingesetzt werden. Durch Zugabe von Alkohol werden zusätzlich Protonen für die Übertragung auf den Reaktanden zur Verfügung gestellt. Schließlich kann die Reaktionsdauer (erkennbar an der blauen Farbe des Ansatzes) durch frühere oder spätere Zugabe der Ammonium-chloridlösung verkürzt bzw. verlängert werden. Bei der Synthese des Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecens **33** wurde zunächst das von *Schweikert* [35] beschriebene Verfahren ohne Zugabe von Alkohol bei einer Reaktionsdauer von 20 Minuten angewandt. Nach Abbruch der Reaktion, Befreiung vom Ammoniak und Suspendierung des Rückstandes in Wasser wurde mit Ether extrahiert und säulenchromatographisch gereinigt.

Die NMR-Spektren und GC/MS-Untersuchungen ließen das gewünschte Produkt erkennen, jedoch begleitet von Nebenprodukten, die eine an den Aromaten teilhydrierte Struktur aufwiesen. Aus diesem Grund wurde die Reaktionszeit auf sieben Minuten verkürzt und vor dem Einleiten des Ammoniaks in den Kolben wurden drei Tropfen wasserfreien Ethanol zum Edukt gegeben. Nach oben beschriebener Aufarbeitung erhielt man ein weißes Pulver in einer Ausbeute von 78%, das sich in GC-Untersuchungen zu 99% als rein erwies und dessen Identität sowohl in NMR-Spektren, als auch im Massenspektrum als die der Zielverbindung bestätigt werden konnte. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt als Strukturbeweis das Signal der nach Spaltung der C-N-Bindung entstandenen Methylengruppe in Position 15 als nicht aufgelöstes Multiplett bei 3,9 bis 4,0 ppm. Als ein solches Signal und ebenfalls bei etwa 4 ppm treten auch die entsprechenden Methylenprotonen der von anderen Mitgliedern des Arbeitskreises dargestellten Dibenz- und Benzindoloazecine in ihren NMR-Spektren auf ([24],[35]). Auch alle restlichen Signale des aliphatischen Bereiches von Verbindung **33** erscheinen nur teilweise oder gar nicht aufgelöst (s. auch Kap. 2.1.4.1).

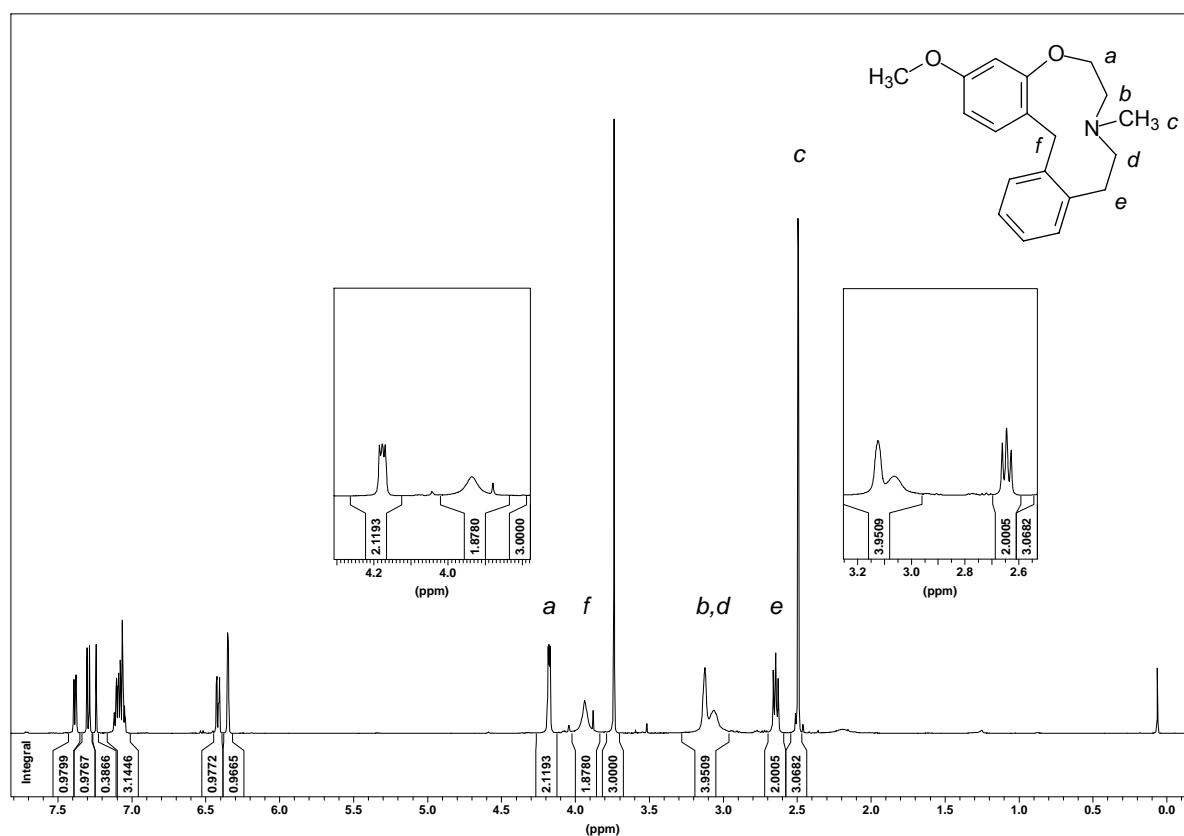


Abb. 2.18: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenzo[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecen (**33**)

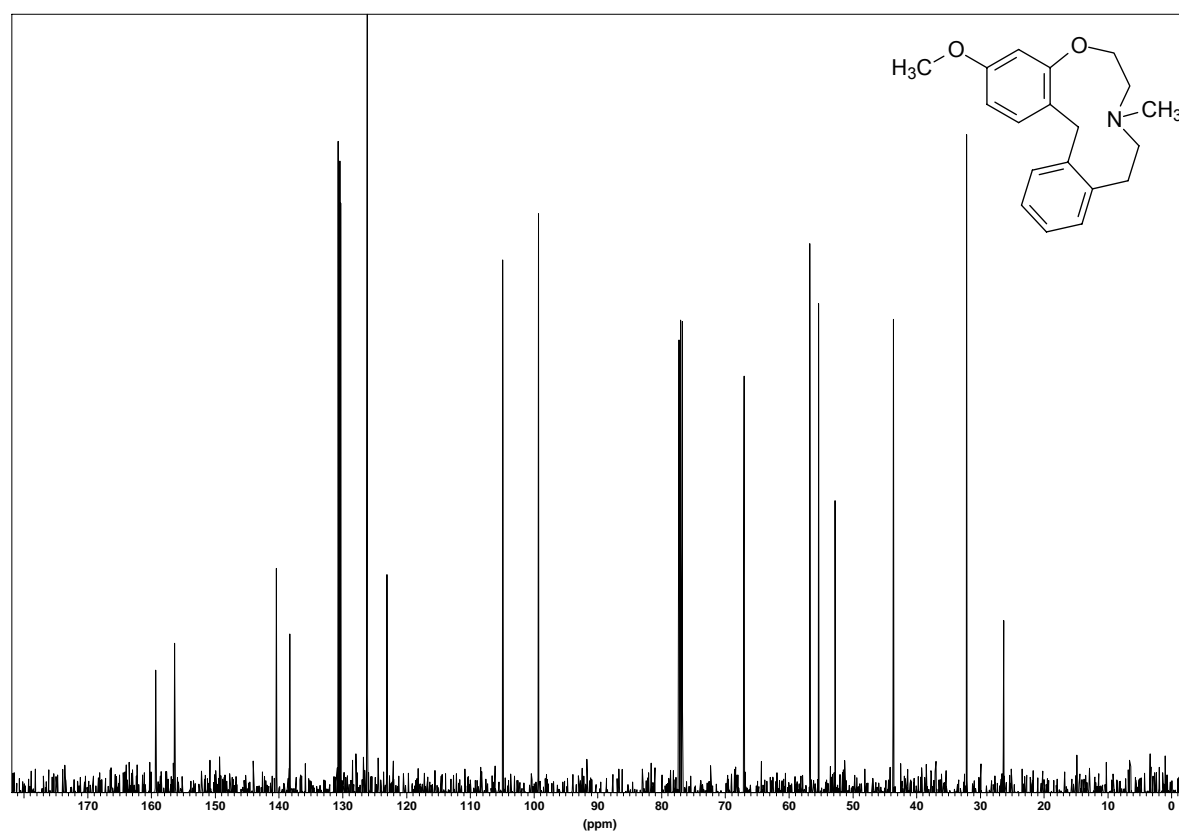


Abb. 2.19: ^{13}C -NMR-Spektrum von **33**

Abundance

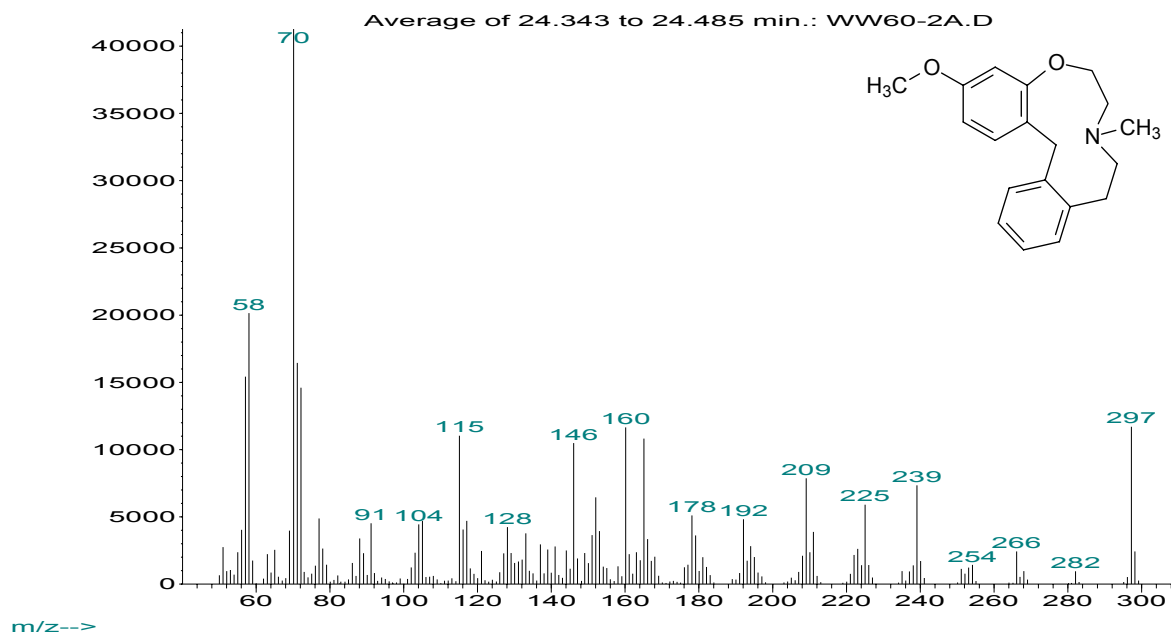


Abb. 2.20: MS-Spektrum von 3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenzo[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecen (**33**), M (**33**) = 297 g/mol

2.1.4.1 Strukturelle Aspekte des 3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenzo[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecens

Die ^1H -NMR-Signale der N-Methylgruppe und der im oberen Teil des zentralen Ringes benachbarten Methylenprotonen am C-7 Atom des Dibenzo-oxa-azacycloundecens (**33**) liegen deutlich weiter im Tieffeld als die entsprechenden Signale des von *Enzensperger* [47] dargestellten homologen 12,13-Dimethoxy-7-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydro-5H-dibenz[d,g]-2-azacycloundecens (**34**).

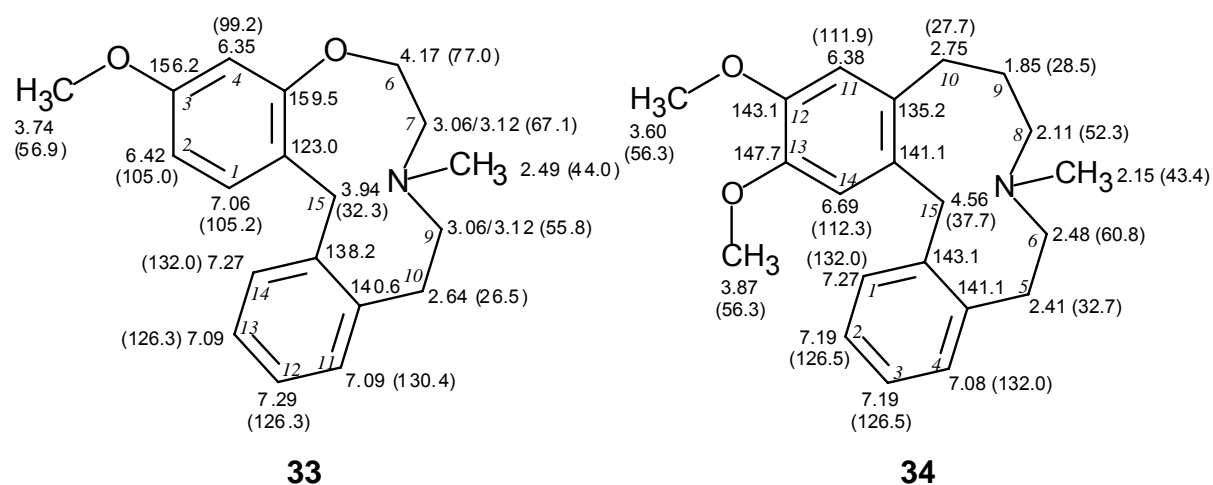


Abb. 2.21: ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Daten in ppm für die homologen Dibenzo-aza-cycloundecene **33** und **34**.

Während für das Azacycloundecen **34**, wie auch für das Benzindoloazecin **LE 300** aufgrund der zu beobachtenden Hochfeldverschiebung der exozyklischen N-Methylgruppe (1,99 ppm beim **LE 300** [24]) und besonders der Methylengruppe am C-8 Atom in **34** gegenüber den zu erwartenden Werten eine käfigartige ("cage - like") Struktur angenommen wird, bei der sich die genannten Gruppen über den aromatischen Ringen und damit im Einfluß ihres paramagnetischen Feldes befinden, kann für das Dibenz-oxa-azacycloundecen **33** daher eine mehr gestreckte Konformation angenommen werden. Hier finden sich die Signale der N-Methylgruppe und der Methylenprotonen am C-7 Atom deutlich weiter im Tieffeld, und damit nicht so sehr unter dem Einfluß des paramagnetischen Feldes des aromatischen Bereichs. Ein dankenswerterweise von Herrn Matthias Weigt aus dem Arbeitskreis Prof. Wiese vom Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn am Computer durchgeführtes "simulated annealing" (1000K bis 0K) zur Konformationsanalyse der Verbindung **33** ergab eine Population von sechs Konformeren für einen RMS-Wert von $<1\text{\AA}$ nach 100 Zyklen, denen eine semiempirische quantenmechanische Berechnung folgte (Austin Model 1, MOPAC 7.0).

In der folgenden Abbildung ist die energieärmste Konformation aus diesen sechs gezeigt. Entsprechend den oben diskutierten NMR-Daten stehen die N-Methylgruppe und die benachbarte Methylengruppe nicht unter dem direkten Einfluß des paramagnetischen Feldes der aromatischen Ringe.

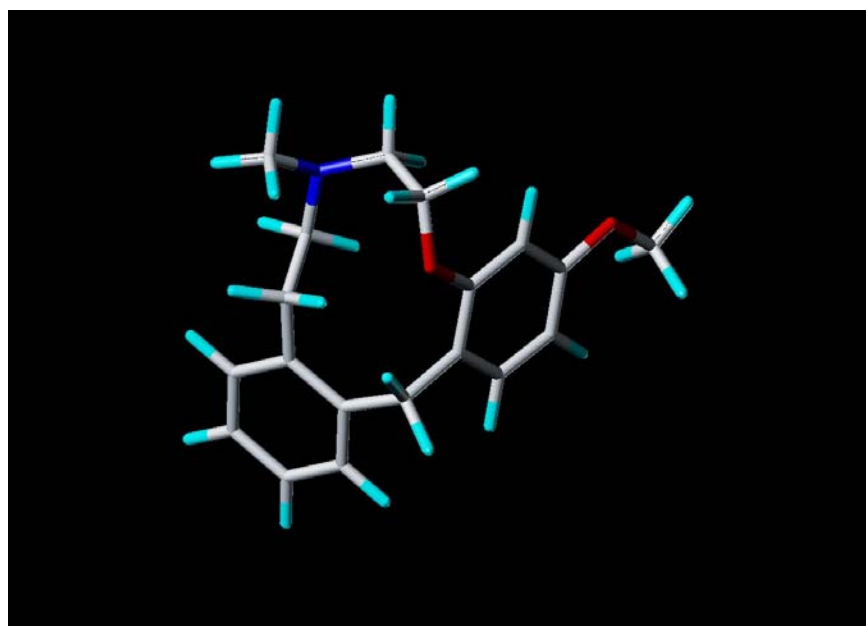


Abb. 2.22: Mit Hilfe eines "simulated annealings" berechnete energieärmste Konformation von **33**

2.1.5 Synthese des 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[*g*,*j*]-1-oxa-4-azacycloundecen-3-ols

Untersuchungen in der Dibenz[*d*,*g*]azecin-Reihe zeigten, daß eine Hydroxylierung am Aromaten die Affinität zu Dopamin-Rezeptoren dramatisch steigern kann. Aus diesem Grund erschien die Synthese der Monohydroxyverbindung **40** (s. Abb. 2.24) besonders attraktiv. Schweikert [35] erhielt das hydroxylierte Dibenzo-chinolizin **36** als Vorstufe des Dibenz-azecins **LE 404** durch Etherspaltung der Methoxyverbindung **35** mit HBr. Analog wäre in der Oxa-homologen Reihe die Umwandlung von **32** zu **37**. Auf diesen Versuch wurde verzichtet, da eine Spaltung der zweiten Etherfunktion unter Bildung offenkettiger Produkte zu erwarten war (z. B. **38**).

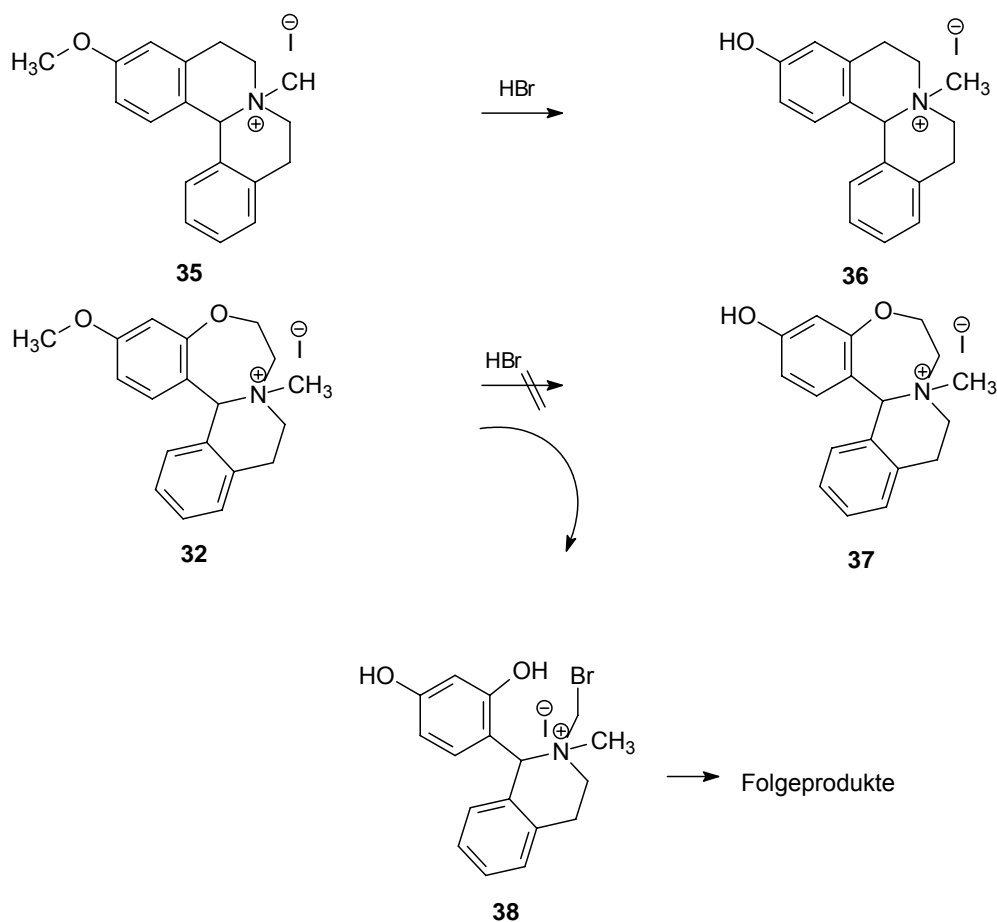


Abb. 2.23: Problem der Etherspaltung bei Oxa-homologen der Dibenz[*a*,*h*]chinolizine

Alternativ kam eine Benzylgruppe als Schutz für die phenolische OH-Gruppe in 3-Stellung in Frage. Die Wahl dieser Schutzgruppe bot die Chance, unter den Bedingungen der folgenden *Birch*-Reduktion mit entfernt werden zu können.

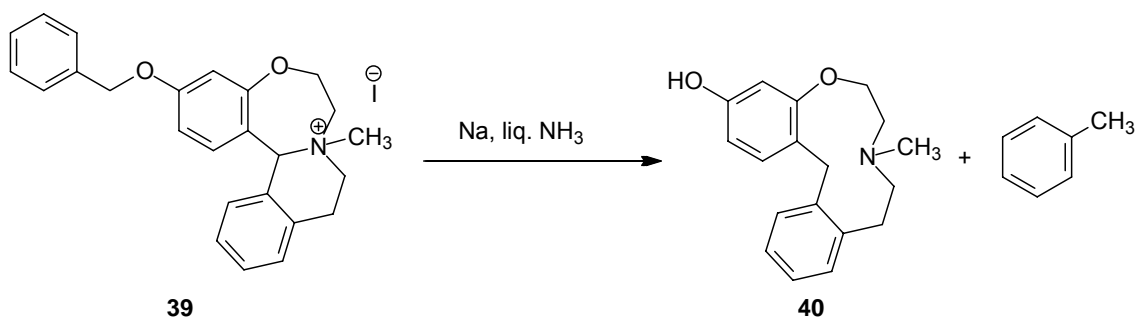


Abb. 2.24: Spaltung und gleichzeitiges Entschützen des quartären Oxa-Homo-Chinoliniumsalzes **39** unter den Bedingungen einer Birch-Reduktion

Büchi *et al* [48] beschreiben bei der Synthese des Naturstoffes Aflatoxin M₁ genau diese Abspaltung einer Benzyl-Schutzgruppe von einer phenolischen Vorstufe des Aflatoxins unter *Birch*-Bedingungen in Anwesenheit einer heterozyklischen Etherfunktion. Die Einführung der Benzyl-Schutzgruppe mußte bereits vor der Umsetzung des Phenols mit dem 2-Methyl-2-oxazolin zum Acetamid als Vorstufe des Phenoxyethyl-amins **43** erfolgen (s. Abb. 2.25). Dies geschah nach einer Methode von Amabilino *et al* [49] zur Mono-benzylierung von Resorcin. Das 3-Benzyloxyphenol (**41**) entsteht hierbei durch eine Reaktion von einem zehnfachen Überschuß Resorcin mit Benzylbromid. **41** konnte nun analog der bereits in Kap. 2.1.4 beschriebenen Methode von Su [40] ohne Probleme mit 2-Methyl-2-oxazolin in **42** übergeführt werden, das - wie das 3-Methoxy-derivat - zunächst als Öl anfiel, jedoch nach Anreiben mit wenig Ethanol bei 4°C langsam kristallisierte und keiner weiteren Aufreinigung bedurfte. Dieser Methode weiter folgend, wurde im anschließenden Hydrolyseschritt mit Phosphorsäure jedoch auch die Benzyl-Schutzgruppe abgespal-

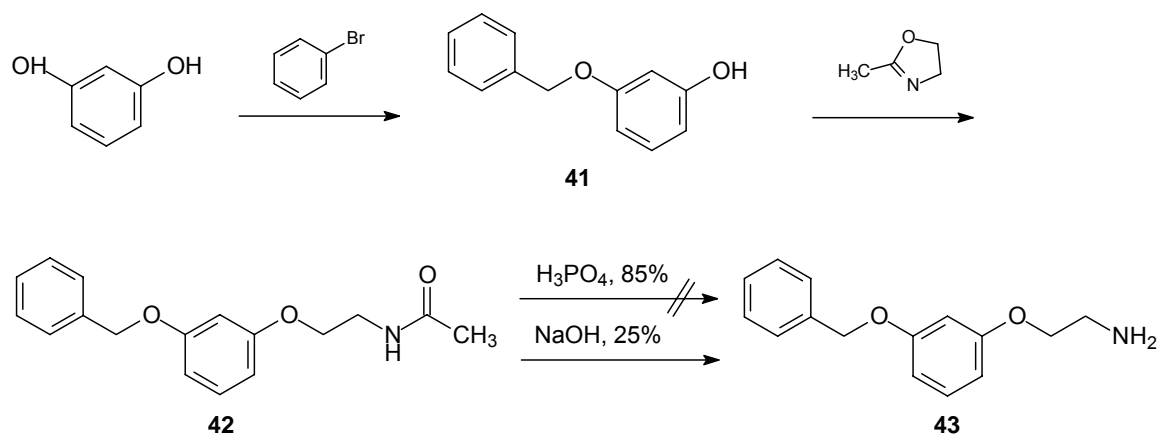


Abb. 2.25: Darstellung des geschützten 3-Hydroxy-Phenoxyethylamins **43** durch alkalische Hydrolyse des Acetamid-Intermediates .

ten. Das charakteristische Signal für die Benzyl-(Methylen)gruppe bei etwa 5,0 ppm im NMR-Spektrum der Amid-Vorstufe fand sich nach dieser Reaktion nicht mehr.

Abweichend von der Literatur wurde nun versucht, das Amid **42** im alkalischen Medium zu hydrolysieren. Dies geschah aufgrund der schlechten Löslichkeit des Amids in rein wäßriger Natronlauge in einer ethanolischen, 25%igen Natronlauge. Die Reaktionszeit mußte allerdings gegenüber der phosphorsauren Hydrolyse des Methoxyderivates (16h), auf 36h erhöht werden. Die weiteren Syntheseschritte zum 3-Benzoyloxy-isochino[2,1-d][1,4]benzoxazepin (**49**) wurden, wieder der Methode *Meise und Schlüters* [36] folgend, nach Abb. 2.27 analog zur Synthese des 3-Methoxy-Analogons durchgeführt.

Die NMR-Spektren der Zwischenstufen sind ähnlich denen der 3-Methoxy-Derivate. Beispielhaft sei hier wieder das ^1H -NMR-Spektrum des entschützten Benzoxazepins **47** aufgeführt (s. auch Abb. 2.17). Deutlich ist hier das Signal der beiden Protonen der Benzyl-(Methylen)gruppe als Singulett bei 5,18 ppm zu erkennen. Die Signale der aliphatischen Protonen im Benzoxazepinring erscheinen auch hier nicht, oder nur

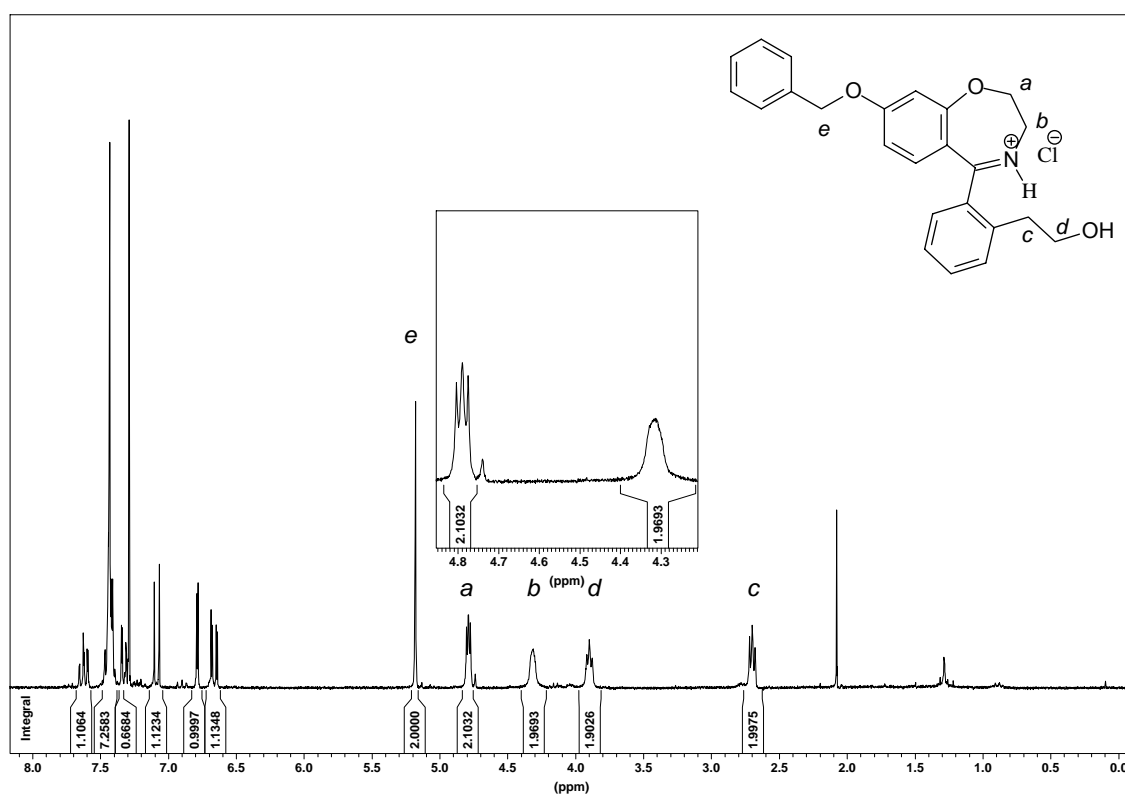


Abb. 2.26: ^1H -NMR-Spektrum von 2-[2-(8-Benzoyloxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)]-ethanol hydrochlorid (**47**), (verunreinigt mit Wasser [2,05 ppm] und Chloroform [7,25 ppm]).

teilweise aufgelöst (Feldstärke hier: 250 MHz). Die aromatischen Protonen der Benzylgruppe fallen zu einem Multiplett bei 7,25 bis 7,40 ppm zusammen.

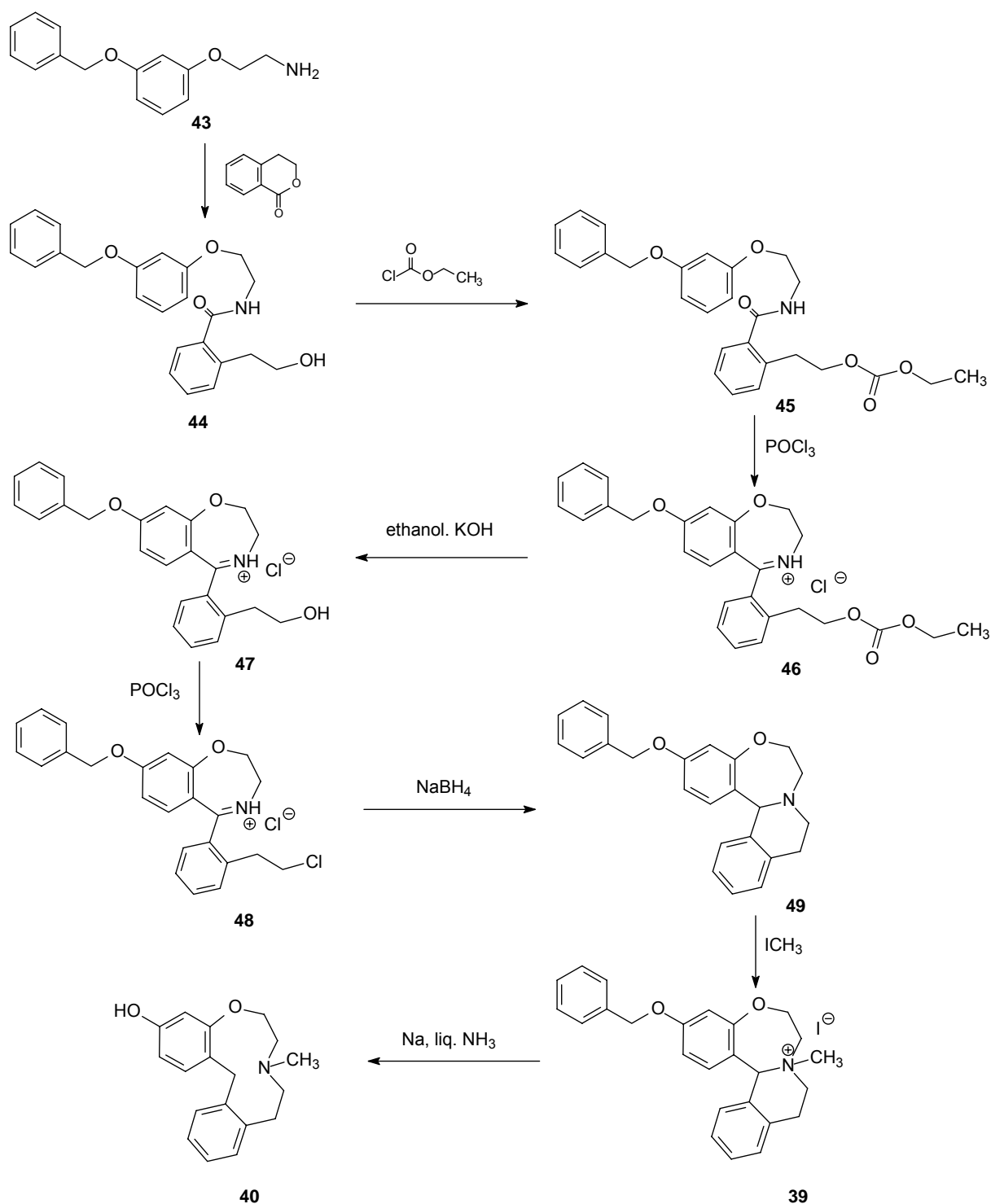


Abb. 2. 27: Synthese des 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecen-3-ols (**40**)

Nach Austausch der OH-Gruppe gegen Chlor und dem reduktiven, zweiten Ringschluß mit Natriumborhydrid wurde das Isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepin **49** wiederum erst nach der – gleichzeitig als Reinigungsschritt fungierenden – Quarternisierung mit Methyljodid am Stickstoff isoliert und charakterisiert. Im ^1H -NMR-Spektrum des quartären Salzes **39** fällt eine geringe Hochfeldverschiebung des Signals des die beiden Aromaten verbindenden Methinprotons auf, das hier als Singulett bei 5,89 ppm zu finden ist. Im Spektrum des 3-Methoxy-Analogons **32** erscheint es bei 6,18 ppm, *Enzensperger* [47] findet es beim 3,4-dimethoxylierten, isosteren Homo-Chinoliziniumiodid bei 6,0 ppm. Das Methinproton scheint also unter dem Einfluß des durch den Benzolring der Benzyloxygruppe verursachten paramagnetischen Feldes zu stehen. Demnach müßte das Molekül eine Konformation annehmen, bei der sich die Benzyloxygruppe über der Ebene des heterozyklischen Ringsystemes befindet.

Bei der folgenden Ringerweiterung des quartären Oxa-Homo-Chinolizins **39** wurden für die *Birch*-Reaktion die gleichen Bedingungen eingehalten wie bei der Spaltung des 3-Methoxy-Analogons. Auch als Reaktionsdauer unter "*Birch*-Bedingungen" (blaue Farbe durch reagierende solvatisierte Elektronen) wurden wiederum sieben Minuten gewählt, da *Büchi und Mitarbeiter* [48] bei der bereits oben erwähnten Synthese des Aflatoxins die Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe ebenfalls mit Natrium in flüssigem Ammoniak durchführten und eine Reaktionsdauer von fünf Minuten wählten. Sie gaben lediglich Methanol statt Ethanol als "Protonenspender" hinzu. Es konnte also angenommen werden, daß eine Reaktionsdauer von mehr als fünf Minuten ausreichen würde, um die Benzylgruppe quantitativ zu entfernen. Eine signifikante Verlängerung der Reaktionszeit sollte vermieden werden, da eine dann einsetzende Teilhydrierung der Aromaten zu befürchten war.

Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes mußte den phenolischen Eigenschaften der Zielverbindung **40** angepaßt werden. So wurde nach Verdampfen des Ammoniaks und Suspendierung in Wasser zunächst mit 2N Salzsäure ein pH-Wert von etwa neun bis zehn eingestellt, bevor mit Diethylether extrahiert wurde. Nach säulenchromatographischer Reinigung des erhaltenen Öls verblieb ein gelbes Harz in sehr geringer Ausbeute (4,5%), dessen Identität mittels NMR- und Massenspektroskopie als die der Zielverbindung **40** gesichert werden konnte (s. Abb. 2.29, 2.30 und 2.31). Die der Massenspektroskopie vorgeschaltete gaschromatographische Analyse (GC/MS-Verfahren) ergab einen Reinheitsgrad der Substanz von 95,2 Prozent

(s. Abb. 2.28), während die Elementaranalyse nicht den üblicherweise geforderten Reinheitskriterien entsprach ($\pm 0,4\%$ für C,H und N). Im Massenspektrum ist der Molpeak für eine Masse von 283 Dalton zu erkennen und ein nahezu identisches Fragmentierungsmuster wie beim 3-Methoxy-substituierten Dibenz[*g,j*]-oxa-azacycloundecen (**33**).

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt die Protonen der charakteristischen, ebenso bei der Ringerweiterung zu den Azecinen und Aza-cycloundecen entstehenden Methylen-Gruppe am C-15 Atom der Zielverbindung **40** bei 3,82 ppm. Das Signal der N-Methylgruppe liegt hier mit 2,39 ppm um 0,1 ppm hochfeldverschoben im Vergleich zum Methoxy-substituierten Analogon **33**. Da das homologe 3-Hydroxy-dibenz[*d,g*]aza-cycloundecen nicht vorlag, können Rückschlüsse auf konformative Unterschiede zur methylierten Verbindung **33** jedoch nur vage sein (s. Kap. 2.1.4.1).

Versuche zur Steigerung der Ausbeute durch Optimierung des Extraktionsverfahrens blieben leider erfolglos. Sowohl leichte Veränderungen des pH-Wertes in einem Spektrum von pH 5 bis 11, als auch die Wahl anderer Lösungsmittel zur Extraktion wie z. B. Chloroform oder 2-Propanol erbrachten keine Verbesserung.

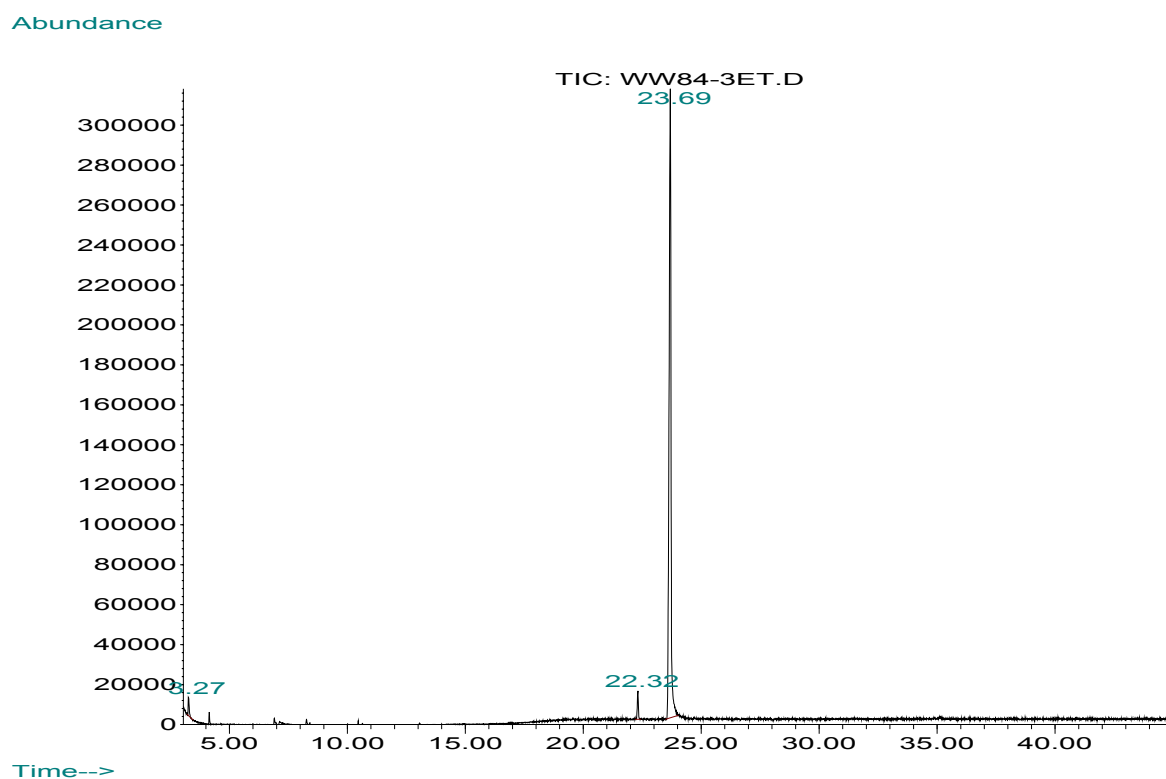


Abb. 2.28: Gaschromatogramm von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecen-3-ol (**40**) (MS-Detektion)

Abundance

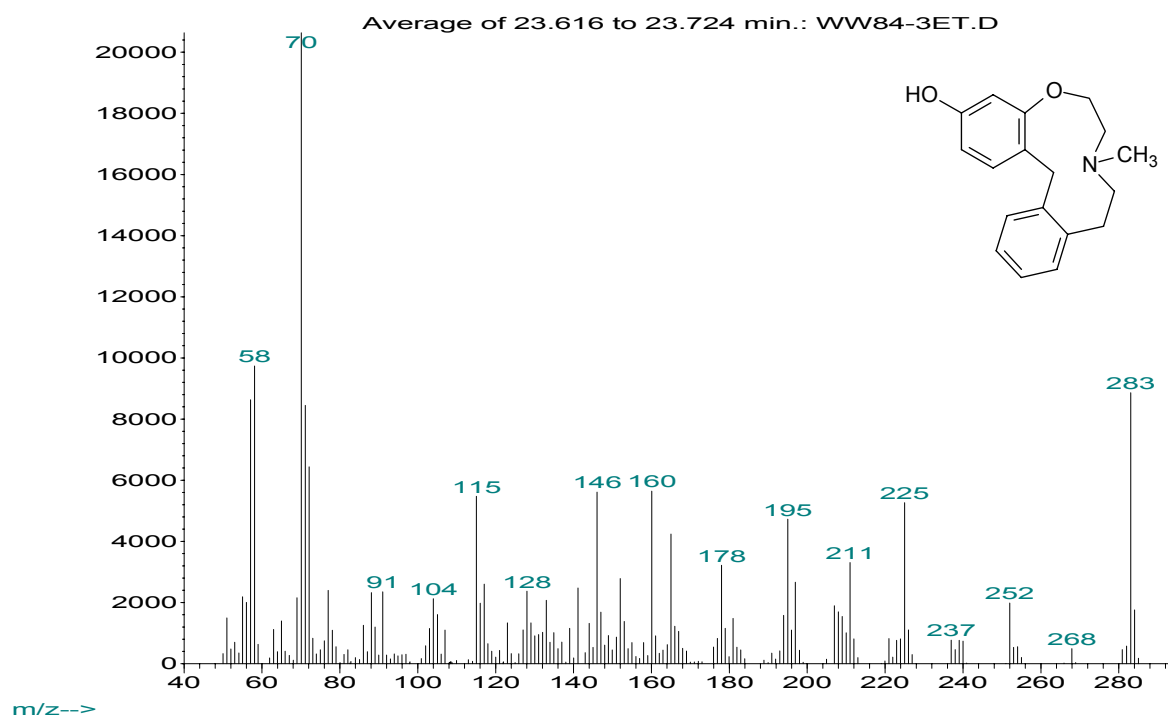


Abb. 2.29: Massenpektrum von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecen-3-ol (**40**), M (**40**) = 283 g/mol

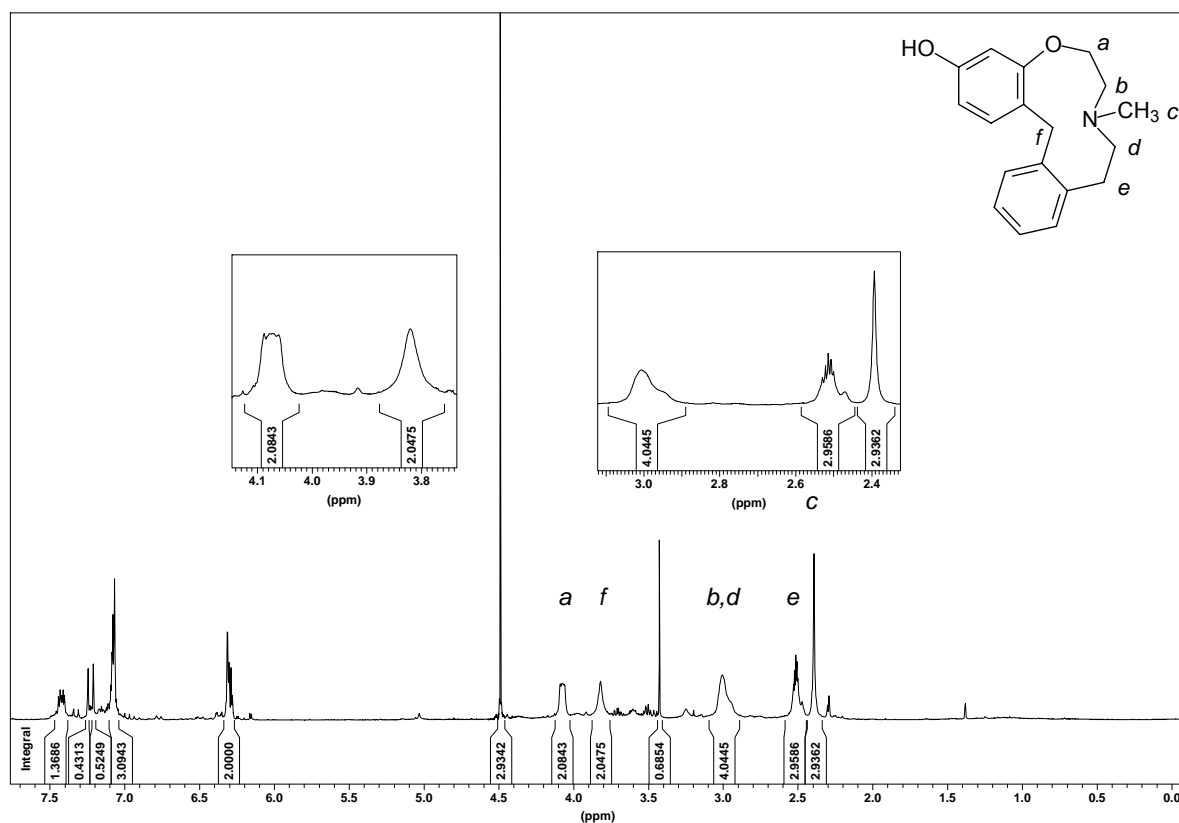


Abb. 2.30: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecen-3-ol (**40**) (verunreinigt mit DMSO [2,5 ppm], Wasser [3,4 ppm] und einer unbekannten Substanz [4,5 ppm]).

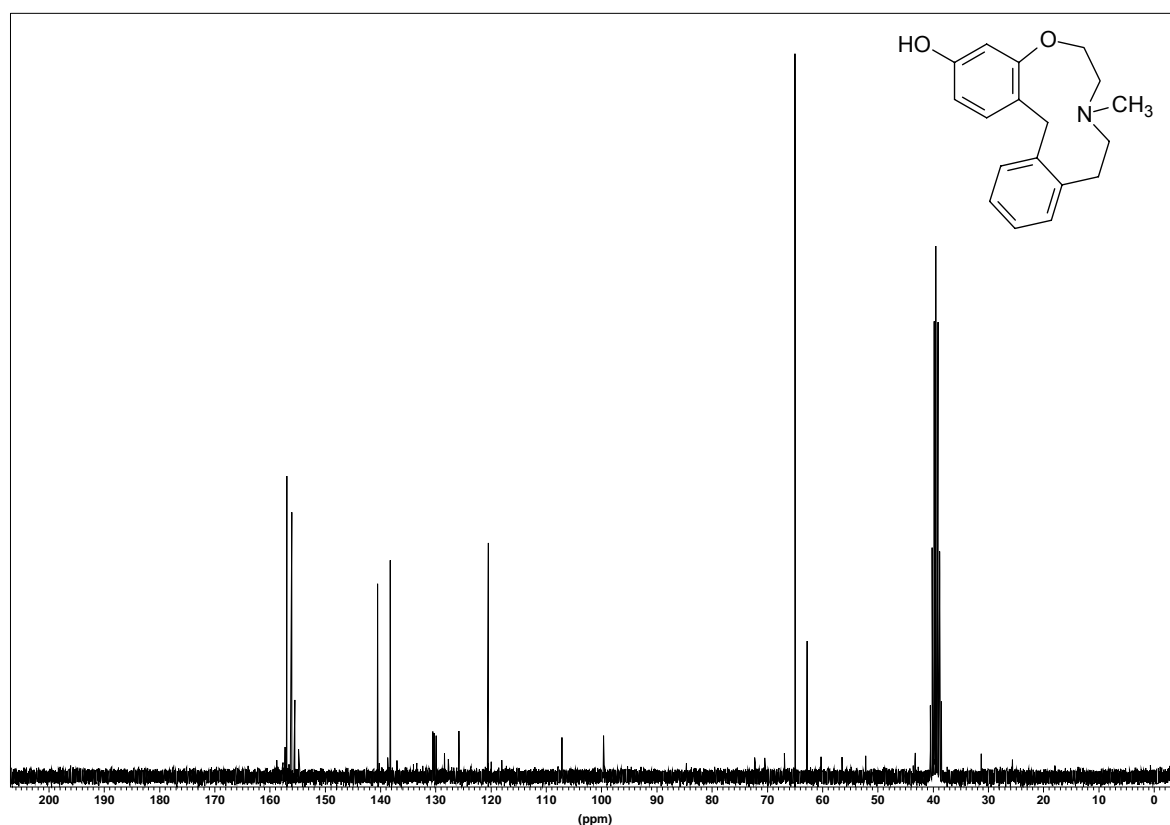
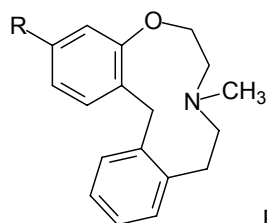


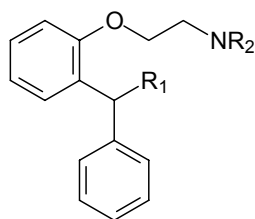
Abb. 2.31: ^{13}C -NMR-Spektrum von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecen-3-ol (**40**), (verunreinigt mit DMSO [40,0 ppm], und unbekannter Substanz [99,5 ppm]).

2.2 Offenkettige Analoga der Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene

(2-Benzylphenoxy)-alkylamine stellen offenkettige Analoga der in den vorigen Kapiteln beschriebenen Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene dar. Ihnen "fehlen" gewissermaßen die beiden Methylengruppen in Position neun und zehn des Heterozyklus.



$\text{R} = \text{H}, \text{OH}, \text{OCH}_3$



$\text{R}_1 = \text{H}, \text{OH}$
 $\text{NR}_2 = \text{zyklische und nicht-zyklische Alkylamine}$

Abb. 2.32: Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene und offenkettige Analoga

Die gegenüber den Dibenz[*d,g*]azecinen bereits verminderte Rigidität der elfgliedrigen Ringsysteme ist bei den im Folgenden beschriebenen Verbindungstypen also vollkommen aufgehoben. Einige der im Folgenden beschriebenen (2-Benzylphenoxy)-alkylamine sind bereits aus der Literatur bekannt, wurden aber über einen neuen Syntheseweg dargestellt. Zusätzlich wird die Synthese neuartiger Verbindungen beschrieben, die sich entweder in der Struktur der Aminfunktion oder der Substitution am Benzyl - C - Atom von den beschriebenen Substanzen unterscheiden. Die in der Literatur beschriebenen Verbindungen wurden zum Zwecke einer pharmakologischen Testung auf eine antihistaminerge Wirkung getestet. Die im Folgenden beschriebenen Substanzen sollen ebenso wie ihre rigidisierten Analoga (s. Kap. 2.1.4 und 2.1.5) auf ihre Affinität zu Dopamin-Rezeptorsubtypen untersucht werden, die - wie die Histaminrezeptoren - G-Protein gekoppelte Rezeptoren darstellen.

2.2.1 Literaturbekanntes zur Synthese von (2-Benzylphenoxy)-alkylaminen

Bereits Ende der vierziger Jahre des vorigen Jahrhunderts wurden in der Arbeitsgruppe um *S. B. Binkley* bei der Firma Bristol Alkylaminoalkylether von 2-Benzylphenolen hergestellt, da man sich von ihnen eine antihistaminerge Wirkung erhoffte.

Wheatley [50] beschreibt zwei mögliche Wege zur Synthese der (2-Benzylphenoxy)-alkylamine. Die damals noch nicht im Handel erhältlichen 2-Benzylphenole wurden durch C-Alkylierung von Phenol mit Benzylhalogeniden nach *Claisen* hergestellt. Hieran schloß sich eine *Williamson*-Ethersynthese der Phenolate mit Aminoalkylchloriden direkt zu den Zielverbindungen oder mit Ethylenbromid zum β -Bromoethylether an. Dieser konnte unter Druck in einem hochsiedenden Lösungsmittel mit den entsprechenden Alkylaminen in die Zielverbindungen übergeführt werden.

Kikumoto und Mitarbeiter [51] benutzten ebenfalls eine *Williamson*-Ethersynthese zur Bildung von ω -Bromoalkylethern der 2-Benzylphenole. Sie setzten dabei allerdings Dibromalkane als Alkylantien ein. Die bromoalkylierten Phenole wurden dann mit den entsprechenden Aminen umgesetzt, wozu keine näheren Angaben gemacht werden.

Riffkin und Mitarbeiter [52] beschreiben die Umsetzung vom β -Chloroethylether des

2-Benzylphenols mit *N*-Methylpiperazin durch einfaches Refluxieren zusammen mit wasserfreiem Natriumcarbonat und Kupferpulver in Xylen.

In diese Betrachtungen mit einbezogen werden sollte auch die Umsetzung 2-substituierter Phenole zu ω -Aminoalkoxyethern nach der bereits in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Methode von *Smith und Mitarbeitern* [43], die sich hierzu der *Mitsunobu*-Reaktion bedienen, indem sie (2-Hydroxyethyl-)phtalimid mit einem ortho-substituierten Phenol zum entsprechenden Ether umsetzen und diesen dann in das primäre Amin überführen.

Die Bildung von Arylalkylethern aus Phenolen und Aminoalkylalkoholen nach *Mitsunobu* ist in der Literatur beschrieben für primäre und sekundäre Alkohole, die jedoch in maximal äquimolaren Konzentrationen eingesetzt werden sollten, da ansonsten eine Kupplung des Alkohols mit sich selbst zu Dialkylethern zu befürchten ist. [53]

2.2.2 Syntheseplanung

Für die Darstellung der (2-Benzylphenoxy)-alkylamine boten sich - der Synthesestrategie *Wheatley's* [50] folgend - zwei Wege an: Zum einen die Veretherung von 2-Benzylphenol direkt mit den gewünschten Alkylaminoalkyleinheiten zu den Zielverbindungen, zum anderen über den β -Bromoethylether als Intermediat zur weiteren Umsetzung mit den gewünschten Aminen.

Die von *Wheatley* [50] und *Kikumoto* [51] durchgeführte Ethersynthese nach *Williamson* sollte durch die mit wesentlich weniger synthetischem Aufwand durchführbare Reaktion nach *Mitsunobu* ersetzt werden.

Als Edukte sollten 2-Benzylphenol und 2-Benzoylphenol eingesetzt werden, die, soweit die entsprechenden Hydroxyethylamine zur Verfügung standen, direkt zu den Zielverbindungen umgesetzt oder zunächst mit 2-Bromoethanol in den β -Bromoethylether überführt werden sollten.

Dieser sollte dann - der Methode *Riffkins* [52] folgend – als Ausgangsverbindung für weitere tertiäre Amine durch nukleophile Substitutionsreaktionen mit zyklischen oder nicht-zyklischen sekundären Alkylaminen dienen (s. Abb. 2.33).

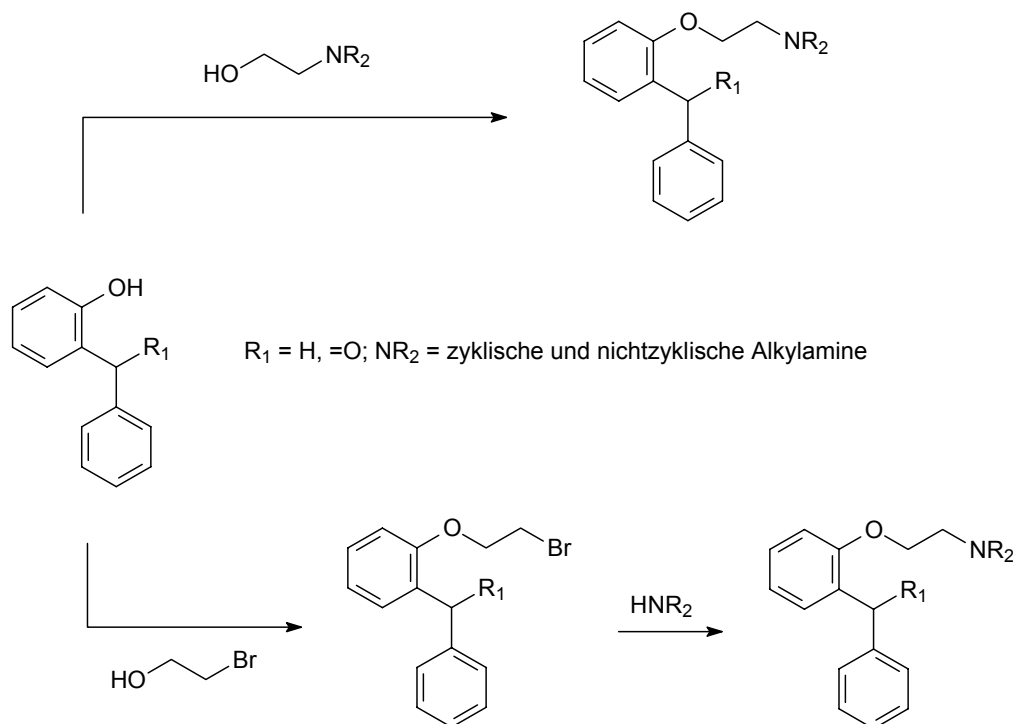


Abb. 2.33: Geplante Synthese von (2-Benzylphenoxy)-alkylaminen

2.2.3 Synthese der Reihe der [2-(2-Benzylphenoxy)ethyl]amine

Die im Folgenden beschriebenen offenkettigen Analoga der Dibenz[*g*,*j*]oxaazacycloundecene wurden durch Aminolyse des zunächst hergestellten β -Bromoethylethers des 2-Benzylphenols **50** synthetisiert (s. Abb. 2.34).

50 konnte abweichend von den in der Literatur beschriebenen Darstellungen [50, 51], die über eine *Williamson*-Ethersynthese erfolgten, nach *Mitsunobu* aus 2-Benzylphenol und 2-Bromoethanol dargestellt werden. Dabei wurden das Phenol, der Alkohol, sowie Triphenylphosphin (TPP) und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) - der Methode *Smith'* [43] folgend - unter Eiskühlung und Schutzgas zusammengegeben und dann weitere 48h bei Raumtemperatur gerührt. Im Unterschied zur Literaturvorgabe wurde nach Beenden der Reaktion und Entfernen des Lösungsmittels der Rückstand in Petrolether aufgenommen und es wurde für kurze Zeit zum Sieden erhitzt. Die polaren, im Gemisch enthaltenen Substanzen fallen dabei als weißer Feststoff aus, während das Produkt in Lösung verbleibt. Der nach Entfernen des Petrolethers verbleibende Feststoff kann aus Ethanol umkristallisiert werden und man erhält das Produkt in sehr reiner Form, wenn auch in Ausbeuten von nur ca. vierzig Prozent. Dies kann an der bereits in Kap. 2.2.1 beschriebenen

Tendenz primärer und sekundärer Alkohole liegen, miteinander zu koppeln und die entsprechenden Ether zu bilden, wenn sie in einer *Mitsunobu*-Reaktion in höheren Konzentrationen mit Phenolen eingesetzt werden [53].

Die anschließende Aminolyse von **50** erfolgte in Anlehnung an die von *Riffkin und Rubin* [52] beschriebene Methode, die den Bromoether mit einem dreifachen Überschuß Amin, wasserfreiem Natriumcarbonat und Kupferpulver in Xylen umsetzten. Die Aufarbeitung erfolgte nach Zugabe von Wasser in der üblichen Weise.

Für die Synthese der im Folgenden beschriebenen Verbindungen **51** – **57** wurde nun ein zehnfacher Überschuß Amin und wenig Kaliumcarbonat als Hilfsbase eingesetzt, auf das Kupferpulver wurde verzichtet. Ferner wurde Toluol statt Xylen als Lösungsmittel verwandt. Diese Modifizierung ermöglichte in vielen Fällen eine schnelle und einfache Aufarbeitung des Reaktionsansatzes, da nach Abfiltrieren des Kaliumcarbonats lediglich das Lösungsmittel im Vakuum entfernt werden mußte, wobei einige der als Edukt eingesetzten Amine, nämlich Pyrrolidin, Piperidin, die beiden Morpholine und die niederkettigen Dialkylamine (s. Abb. 2.34), aufgrund ihres relativ niedrigen Siedepunktes mit aus dem Ansatz entfernt werden konnten. So waren in diesen Fällen meist keine weiteren Reinigungsschritte mehr notwendig. Die Ausbeuten lagen zwischen siebzig und nahezu hundert Prozent.

Wheatley et al [50] beschreiben die Synthese von **51**, **52**, **54** und **55** zunächst als ein instrumentell aufwendiges Verfahren, indem Natrium-benzylphenolat mit dem gewün-

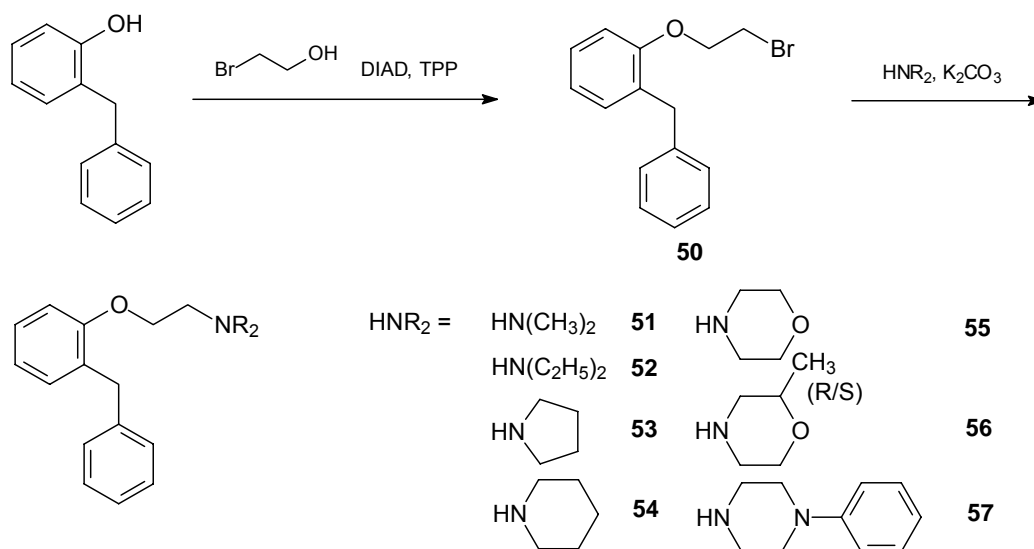


Abb. 2.34: Synthese der Reihe der [2-(2-Benzylphenoxy)ethyl]amine

schten Aminoalkylchlorid unter Druck direkt umgesetzt wird. Hierbei entstand laut *Wheatley* allerdings eine nicht geringe Menge niedrig siedender Nebenprodukte, die nicht näher untersucht wurden. Die Ausbeute war gering. **53** wurde durch Aminolyse des Bromoethers **50** dargestellt, die in einer Druckflasche durchgeführt wurde. Die Aufarbeitung des Rohproduktes erfolgte durch Alkalisierung und Extraktion mit Ether. Aus der Literatur liegen keine spektralen Daten zu den beschriebenen Verbindungen vor, sie sollen daher hier kurz zusammen mit denen der noch nicht beschriebenen Verbindungen diskutiert werden.

In den ^1H -NMR-Spektren von **51** – **57** findet sich das Signal der Methylengruppe am Benzyl-C-Atom als Singulett jeweils bei etwa 4 ppm. Bei dem hier beispielhaft abgebildeten Spektrum des 1-[2-(2-Benzylphenoxy)-ethyl]-pyrrolidins (**53**) liegt es bei 4,05 ppm. Die Signale der beiden Methylengruppen zwischen der Ether- und der Aminfunktion spalten jeweils zu einem Triplett auf, während die zyklischen Methylengruppen in ihrer freien Drehbarkeit eingeschränkt sind und als Multipletts weiter im Hochfeld erscheinen. Die als Öle anfallenden Verbindungen **51** – **56** wurden zur dadurch besser durchführbaren analytischen Charakterisierung in ihre Hydrochloride übergeführt, Verbindung **57** ist ein Feststoff.

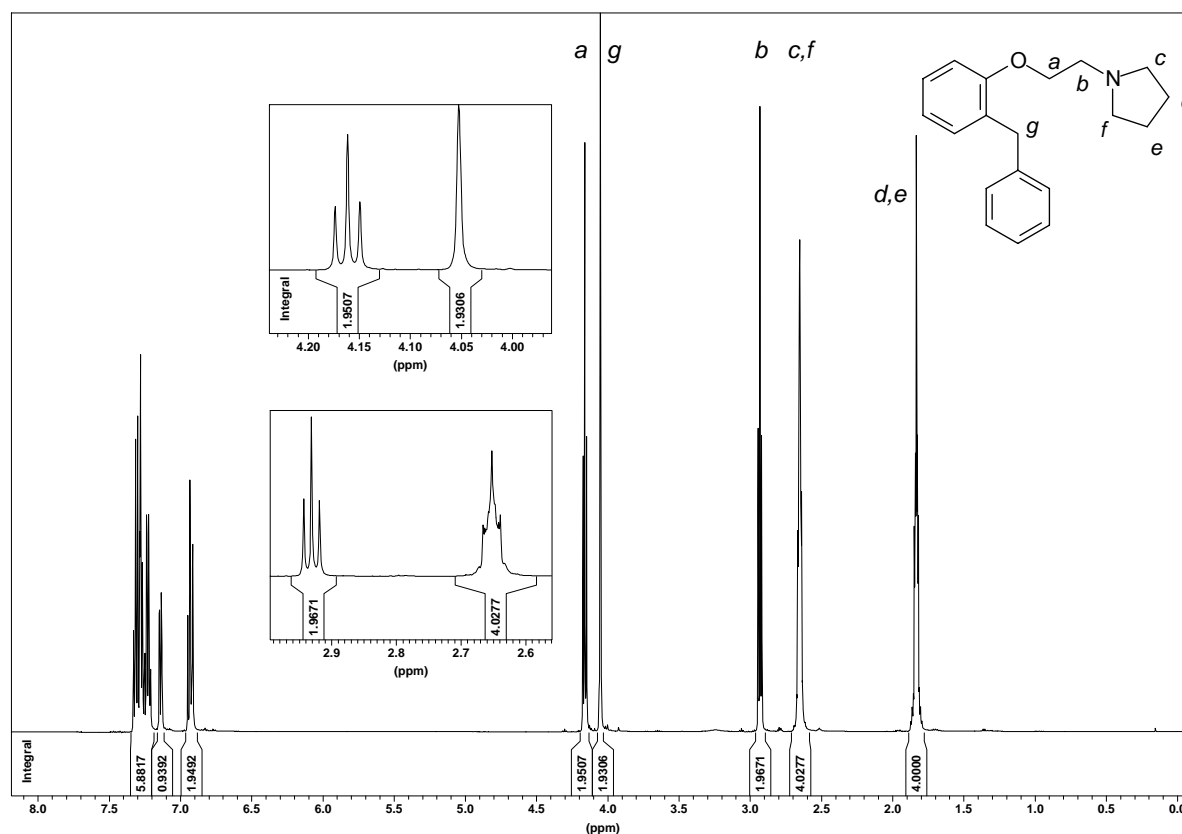


Abb. 2.35: ^1H -NMR-Spektrum von [2-(2-Benzylphenoxy)ethyl]amin (**53**)

2.2.4 Synthese des 1-[3-(2-Benzylphenoxy)propyl]pyrrolidins

Die Synthese des um eine Methylengruppe in der aliphatischen Seitenkette verlängerten Analogons von Verbindung **53** wurde auf dieselbe Art und Weise wie die von **53** durchgeführt. 2-Benzylphenyl-3-bromo-propyl-ether (**58**) konnte wiederum mit einer Ausbeute von nur knapp über vierzig Prozent nach *Mitsunobu* aus 2-Benzylphenol und 3-Bromopropanol dargestellt werden. Die Amino-lyse von **58** mit Pyrrolidin verlief analog und mit gleicher Ausbeute wie die zum Phenoxyethylaminderivat.

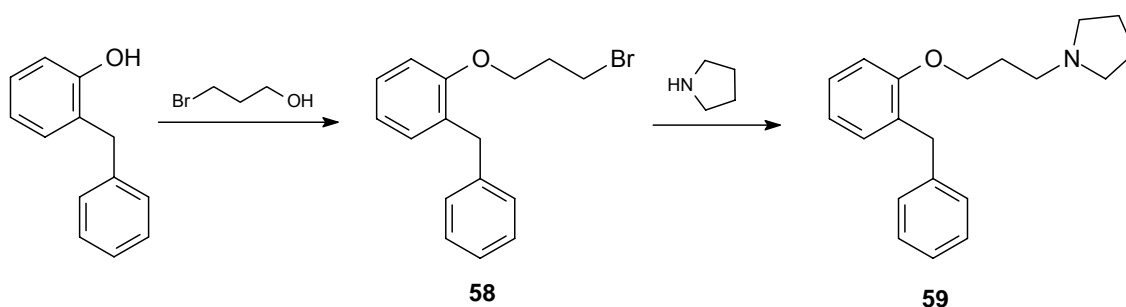


Abb. 2.36: Synthese von 1-[3-(2-Benzylphenoxy)propyl]pyrrolidin (**59**)

Im ¹H-NMR-Spektrum des 1-[3-(2-Benzylphenoxy)propyl]pyrrolidins (**59**) findet man ein zusätzliches Multipllett bei etwa 2 ppm für die dritte aliphatische Methylengruppe, das Signal der der Aminfunktion benachbarten CH₂-Gruppe in der Seitenkette erscheint um 0,4 ppm hochfeldverschoben im Vergleich zum Aminoethylether **53**.

2.2.5 Synthese des Phenyl[2-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)-phenyl]-methanons und Phenyl[2-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)-phenyl]-methanols

Die am Benzyl-C-Atom substituierten Derivate von **53** wurden über eine direkte Veretherung von 2-Benzoylphenol mit (2-Hydroxyethyl)-pyrrolidin nach *Mitsunobu* hergestellt. Zunächst entstand nach der bereits in Kap. 2.2.3 und 2.2.4 beschriebenen Methode für die Synthese der β-Bromoethylether **50** und **58** das der Verbindung **53** analoge Benzophenon-derivat **60**. Dabei mußte das erhaltene Rohprodukt im Gegensatz zu den Bromoethern säulen-chromatographisch gereinigt werden. Die direkte Umsetzung des 2-Benzylphenols zur Zielverbindung **60** verlief mit einer im Vergleich zur zweistufigen Synthese der Verbindungen **51** – **57** und **59** weit niedrigeren Ausbeute von zehn Prozent.

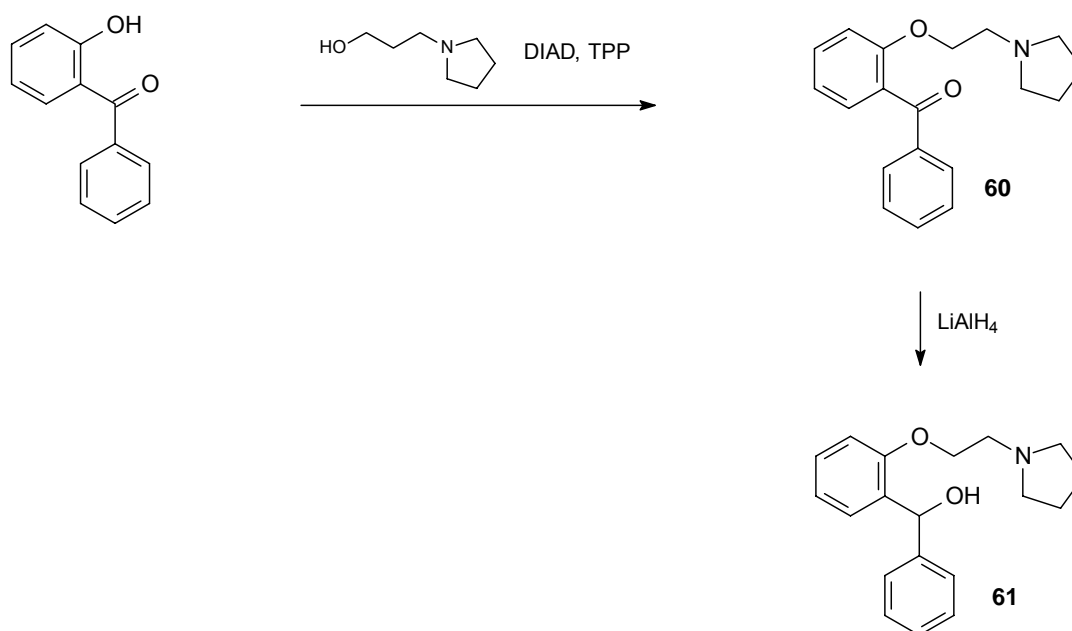


Abb. 2.37: Synthese von Phenyl[2-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)-phenyl]-methanon (**60**) und Phenyl[2-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)-phenyl]-methanol (**61**)

Hieran schloß sich die weitere Umsetzung von **60** zum Alkoholderivat **61** durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid an, welche in wasserfreiem Diethylether bei Raumtemperatur durchgeführt wurde.

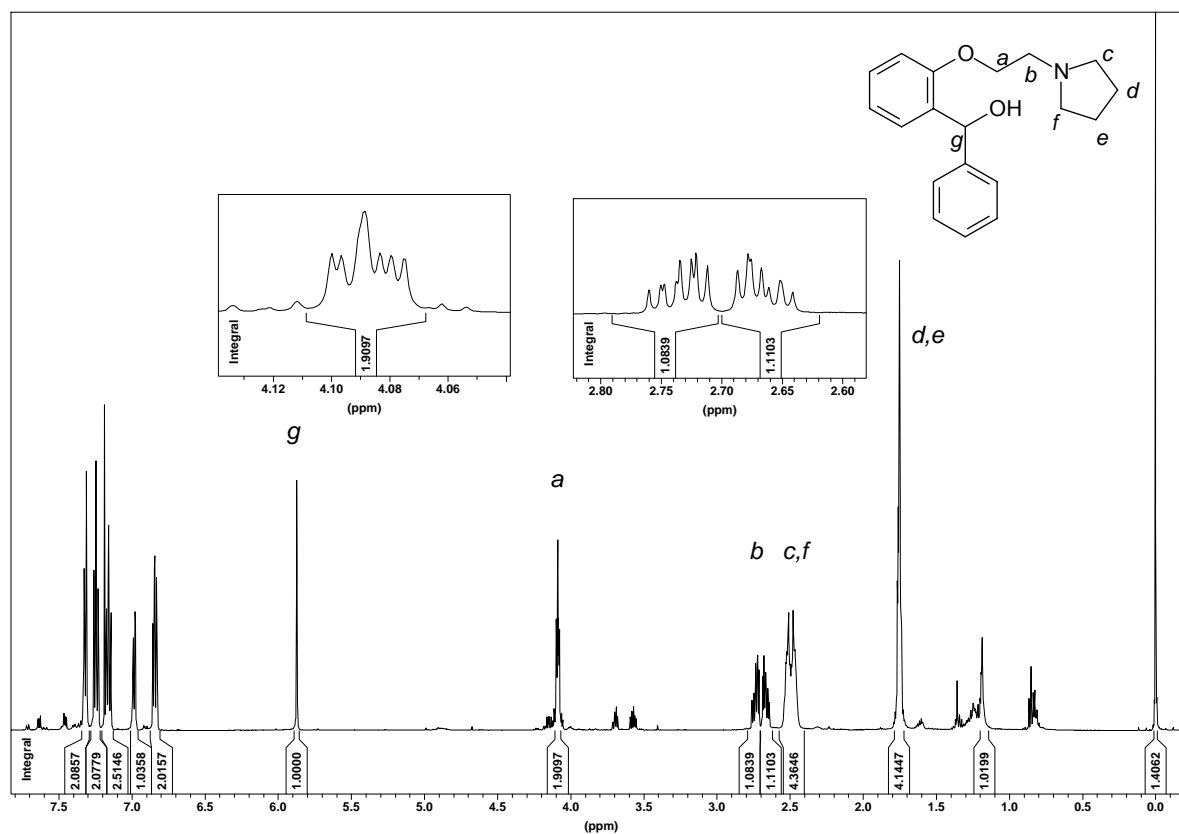


Abb. 2.38: ¹H-NMR-Spektrum von Phenyl[2-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)-phenyl]-methanol (**61**), (leicht verunreinigt [0,8 und 1,2 ppm])

Im ^1H -NMR-Spektrum von **61** ist bei 5,9 ppm das mit Blick auf das Spektrum von **60** neu hinzugekommene Signal des Protons am Benzyl-C-Atom als Singulett zu erkennen. Weiter fällt auf, daß nach Einführung des chiralen Zentrums am Benzyl-C-Atom die Signale der beiden Methylengruppen nicht mehr – wie bei **60** – als Triplets, sondern als deutlich komplexer aufgespaltene Signale erscheinen. Die Protonen an der Aminfunktion benachbarten, nicht mehr chemisch äquivalenten Methylengruppe sind hier sogar als zwei voneinander getrennte Signale zu erkennen.

2.2.6 Synthese des *N*-(2-benzylphenyl)-*N*-(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amins

Als weitere Strukturvariation offenkettiger Dibenz[*g,j*]-oxa-azacycloundecene sollte ein aminoalkyliertes Anilinderivat der Reihe der [2-(2-Benzylphenoxy)ethyl]amine synthetisiert werden, um in späteren pharmakologischen Untersuchungen in dieser Verbindungsklasse den Einfluss des Sauerstoffatoms im Vergleich zu einer Aminfunktion an derselben Position auf die Affinität zu Dopamin-Rezeptorsubtypen untersuchen zu können. Beide Strukturen sollten als Pyrrolidin-Derivat hergestellt werden, um in späteren Struktur-Wirkungs-Untersuchungen mit den in den Kap. 2.2.3 bis 2.2.5 beschriebenen [(2-Benzylphenoxy)alkyl]pyrrolidinen vergleichen zu können. Die Synthese des *N*-(2-benzylphenyl)-*N*-(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amins (**64**) erfolgte ausgehend von 2-Benzylanilin durch Acetylierung mit 2-Bromacetylchlorid zum 2-Bromoacetamid **62**, das als weißer Feststoff aus einer etherischen Lösung des Anilins bei Raumtemperatur ausfällt. **62** wurde dann mit Pyrrolidin aminolysiert, wie bereits in den Kapiteln 2.2.3 und 2.2.4 für die [(2-Benzylphenoxy)alkyl]pyrrolidine beschrieben. Das 2-Pyrrolidin-1-ylacetamid **63** fällt zunächst als öliges Rohprodukt an, das aber in der Kälte erstarrt, und aus Ethanol umkristallisiert werden kann. Im letzten Reaktionsschritt wurde das Amid **63** zum sekundären Amin **64** reduziert. Dies geschah mit Lithiumaluminiumhydrid in wasserfreiem THF und Extraktion des Produktes mit Toluol, wie es auch *Unangst et al* [54] für die Reduktion von (Aryloxy)alkylamiden zu den jeweiligen Aminen beschreibt. Das 2-Pyrrolidin-1-ylethylamin fiel hierbei nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von etwa 30% als beige-brauner amorpher Feststoff an (s. Abb. 2.39).

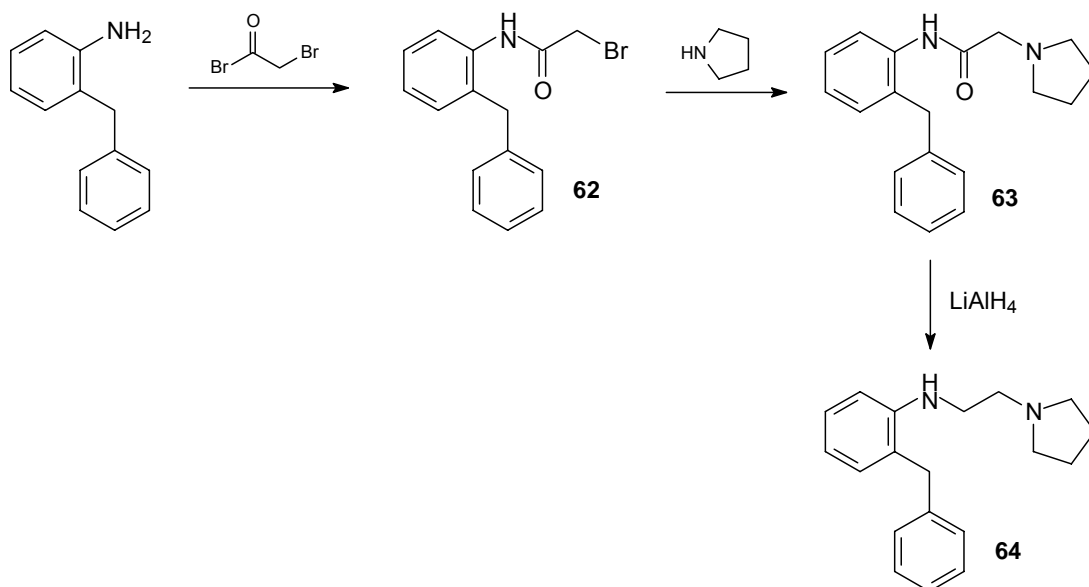


Abb. 2.39: Synthese von *N*-(2-benzylphenyl)-*N*-(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amins (**64**)

Im ^1H -NMR-Spektrum von **64** erscheint das Signal der Methylengruppe neben der sekundären Aminfunktion aufgrund der zusätzlichen Kopplung mit dem NH-Proton

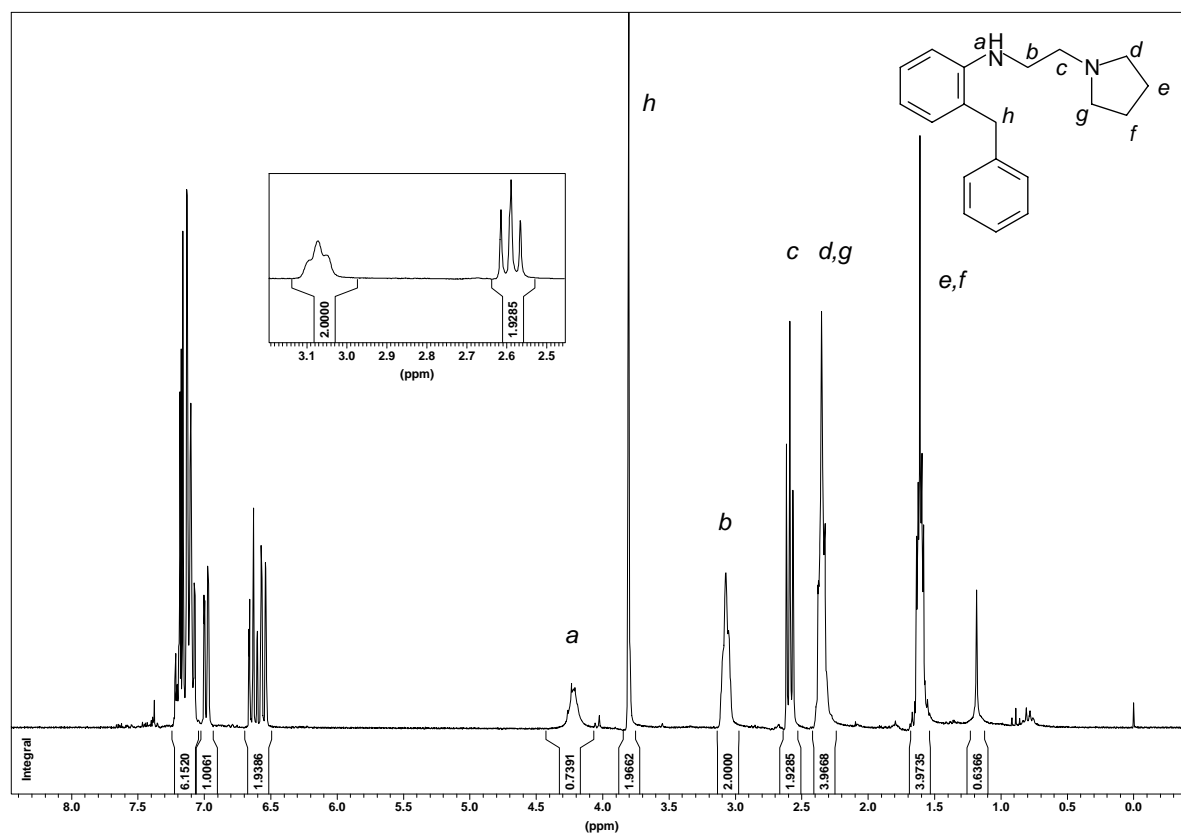


Abb. 2.40: ^1H -NMR-Spektrum von *N*-(2-benzylphenyl)-*N*-(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amin (**64**), (verunreinigt mit Wasser [1,2 ppm])

als nicht mehr aufgelöstes Multiplett bei 3,1 ppm (s. Abb. 2.40), ansonsten ergibt sich hinsichtlich der Aufspaltungsmuster und der chemischen Verschiebungen ein nahezu identisches Bild zum Phenoxyethylderivat **53** (s. Abb. 2.35).

2.3 Synthese dimerer Dibenz[*d,g*]azecine mit unterschiedlich langen Alkylspacern als bivalente Dopamin-Rezeptor-Liganden

Die Anwendung der in der Literatur als "*bivalent ligand approach*" [55] beschriebenen Methode, zwei Pharmakophore, die als Monomere eine biologische Aktivität an – in diesem Falle G-Protein gekoppelten – Rezeptoren aufweisen, in einem Liganden zu vereinen, in dem man sie mit einer Alkylenbrücke verbindet, hatte sich bei den im Vorhergehenden beschriebenen Bis-benzindoloazecinen **65** bereits als erfolgreich erwiesen [29] (s. auch Kap. 1.4). So zeigte der von *Abadi et al* [29] synthetisierte dimere Ligand aus zwei **LE 300** - Einheiten, die über einen aus sechs Methylengruppen bestehenden sog. *spacer* verbunden sind, einen K_i -Wert am hD_1 -Rezeptor, der mit 44 nM nur eine Größenordnung unter dem von **LE 300** liegt (2,3 nM am hD_1 -Rezeptor). Weiterhin wurde eine Korrelation zwischen Affinität und Spacerlänge festgestellt. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten auch dimere Liganden mit Dibenz[*d,g*]azecinen als Monomere (**66**) hergestellt werden, da diese sich in pharmakologischen Untersuchungen als ähnlich affin an Dopamin-Rezeptorsubtypen erwiesen [35] wie die Benzindolo-annelierten Azecine und als Leitstrukturen für die Synthese der in Kap. 2.1 beschriebenen Oxa-Homologe der Dibenz[*d,g*]azecine dienten.

Die Synthese der Dimere **66** wurde auf dieselbe Weise durchgeführt wie die zu den Benzindolo-Dimeren **65**, nämlich durch Quarternisierung der Chinolizin-Vorstufe **67**

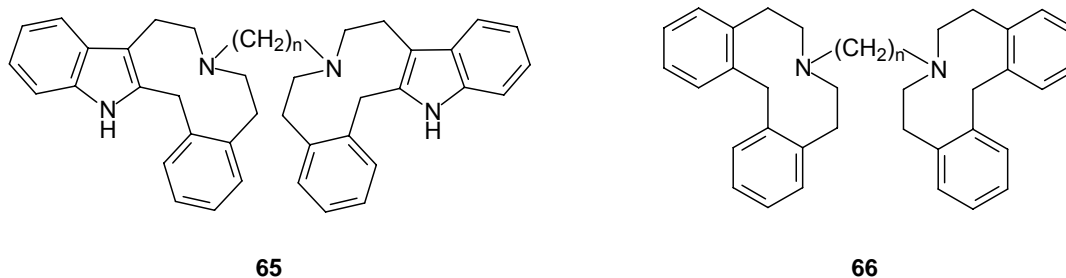


Abb. 2.41: Über Alkylenspacer verbrückte Dimere aromatisch annellierter Azecine

am Stickstoff mit α,ω -Dihalogenalkanen und anschließende Ringerweiterung der tetrazyklischen Einheiten **68** mit Hilfe der *Birch*-Reduktion. (s. auch Abb. 2.42). Die molekulare Verbindung beider monomeren Einheiten fand auf der Stufe der Dibenz[*a,h*] chinolizine statt, die nach dem von *Schweikert* [35] entwickelten *Nitrilweg* (s. Abb. 2.4) hergestellt wurden. Die Umsetzung des Chinolizins **67** mit einem Dibromalkan der gewünschten Kettenlänge im Stoffmengenverhältnis 2:1 lieferte die quartären Salze **68** nach Rühren in 90°C heißem Toluol über Nacht als weiße, amorphe Substanzen in einer im Vergleich zur Synthese der monomeren Analoga (72%, [35]) geringen Ausbeute von ca. 35%. Als Dihalogenalkane wurden Dibromhexan und Dibromheptan eingesetzt, die Zielverbindungen **66** weisen also einen Alkylspacer von sechs oder sieben Methylengruppen auf. *Mohr* [56] beschreibt die Synthese analoger Dibenz[*d,g*]azecin-Dimere mit einem aus vier und fünf Methylengruppen bestehenden Spacer auf die gleiche Weise.

Für die Spaltung zu den dimeren Azecinen **66** wurde eine im Vergleich zur Synthese der Oxa-homologen Azecine längere Reaktionszeit von 15 Minuten gewählt, wie sie auch *Schweikert* [35] für die Darstellung der monomeren Dibenz[*d,g*]azecine beschreibt. Die NMR-Spektren der Bis-azecine **66** zeigen hinsichtlich der aliphatischen Protonen im Azecinring ein übereinstimmendes Bild der Signale und Ihrer chemischen Verschiebungen zum Dibenz[*d,g*]azecin-Monomer **LE 410** [35]. Es fällt

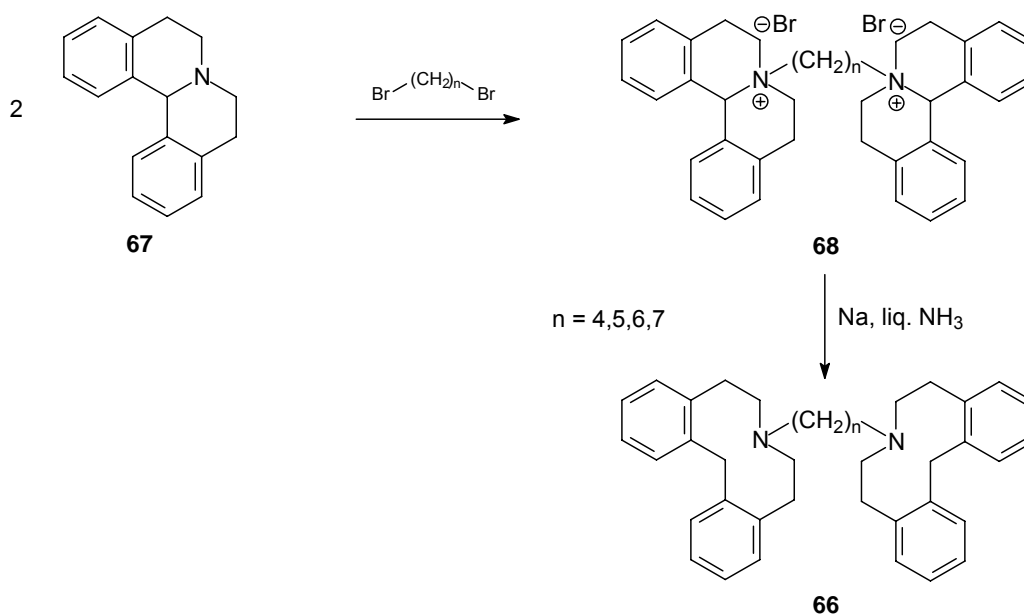


Abb. 2.42: Synthese der dimeren Dibenz[*d,g*]azecine **66**

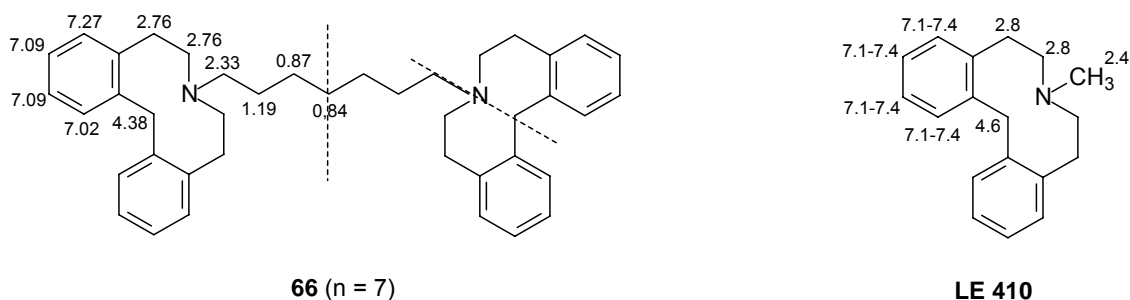


Abb. 2.43: ¹H-NMR-Daten in ppm für das Dibenz[d,g]azecin-dimer **66** und –monomer **LE 410** [35]

jedoch eine enorme Hochfeldverschiebung der Signale der Methylenprotonen in den Spacern auf. (s. Abb. 2.43 und Tab. 2.1). Dieser Effekt ist am stärksten ausgeprägt bei dem Derivat mit fünf Methylenheiten im Spacer. Das Signal der Protonen der mittleren Methylengruppe erscheint hier bei 0,5 ppm [56]. Als Erklärung für die Hochfeldverschiebung erscheint die Annahme einer Konformation, bei der sich die aromatischen Ebenen über die Alkylenprotonen "neigen", plausibel. Die Moleküle liegen in Lösung also offensichtlich nicht gestreckt, sondern in einer "geknäulten" Konformation vor. *Abadi et al* [29] beschreiben diesen Effekt ebenfalls für die mit einem größeren aromatischen System ausgestatteten Benzindoloazecin-Dimere **65**.

<i>n</i>	66	65
4		
5		
6		
7		

Tab. 2.1: ¹H-NMR-Daten der Methylengruppen-Signale im Alkylenspacer von **65** und **66** [29] in ppm.

Diese zeigen in den meisten Fällen eine noch stärkere Hochfeldverschiebung der ^1H -NMR-Signale der Methylengruppen im Spacer (s. Tab. 2.1). Der Effekt ist auch hier bei dem Derivat mit 5 Methylenheiten im Spacer am stärksten ausgeprägt, hier erscheint das Signal der mittleren Methylenprotonen sogar bei 0,1 ppm. (s. Tab. 2.1). Die Integration der Signale der NMR-Spektren von **66** weist auf das Vorhandensein zweier Symetrieachsen im Dimer-Molekül hin. Eine davon verläuft in den Azecinen entlang der gespaltenen C-N-Bindungen, eine zweite teilt den Spacer in zwei gleich große Hälften (s. Abb. 2.43).

3 Pharmakologischer Teil - Methoden und Materialien

3.1 Herstellung von Ganzzeilsuspensionen

Bei früheren im Arbeitskreis durchgeführten Radioligandbindungsexperimenten [27] wurde bereits festgestellt, daß beim Arbeiten mit Membranpräparationen der im folgenden dargestellten Organismen (außer beim D₄- und D₃-Rezeptor) nicht reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich der unspezifischen Bindung erzielt wurden. Da diese zudem sehr hoch ausfiel (> 50%), wurden sämtliche Bindungsstudien an Ganzzeilsuspensionen durchgeführt.

3.1.1 Eingesetzte gentechnisch veränderte Organismen

Zur Durchführung von Radioligandbindungsstudien mit den in der Arbeit beschriebenen Testsubstanzen wurden als Wirtszellen sowohl Human Embryonic Kidney- (HEK) Zellen, als auch Chinese Hamster Ovary- (CHO) Zellen eingesetzt, die selektiv humane, klonierte Dopamin-Rezeptoren exprimierten. Der Einsatz dieser Zellen bietet gegenüber anderen Methoden, wie dem Einsatz von nativem Gewebe (z.B. Membranpräparationen aus Striatumgewebe), den Vorteil, daß eine Interaktion der Testsubstanzen mit anderen als den vorgesehenen Bindungsstellen ausgeschlossen werden kann. Dazu gehören etwa Subtypen der gleichen Rezeptorfamilie (D₁, D₂, D₃, D₄ und D₅), aber auch andere im Gewebe natürlich vorkommende Bindungsstellen, wie etwa weitere G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder auch z.B. Ionenkanäle und Membrantransporter.

Folgende stabil transfizierte Zelllinien wurden erhalten durch Subklonierung der entsprechenden humanen cDNA in einen Expressionsvektor, Transfektion der Wirtszellen mit dem Plasmid und klonale Selektion durch Frau Dr. Barbara Höfgen und Herrn Dr. Matthias Kassack aus unserem Arbeitskreis [26, 25] :

Zelllinie	Wirt	Plasmid	Transfektionsart
HEK-D ₁	HEK293-Zellen	pcDNA3-hD ₁	Roti Fect [®] Reagenz (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
HEK-D ₅	HEK293-Zellen	pcDNA3-hD ₅	Roti Fect [®] Reagenz

Tab. 3.1: Im Arbeitskreis hergestellte, eingesetzte gentechnisch veränderte Organismen; HEK293-Zellen wurden erworben von ATCC, Rockville, USA; CHO-Zellen wurden erhalten von Prof. Dr. H. Bönisch, Univ. Bonn; die Plasmide wurden von Dr. D. Grandy, UC San Francisco zur Verfügung gestellt.

Weitere, bereits stabil transfizierte CHO-Zellen wurden dankenswerterweise erhalten von Dr. van Tol, Toronto, Kanada (hD_{4.4}), und Dr. Shine, Darlinghurst, Australien (hD_{2L}). Die Charakterisierung eingesetzten Zelllinien hinsichtlich der Proteinkonzentration, sowie des K_D- und B_{max}-Wertes ist unter den Kap. 3.1.3, 3.2.1 und 4.1 näher beschrieben.

3.1.2 Arbeiten mit HEK- und CHO-Zellen

3.1.2.1 Inkulturnahme der Zellen

Alle in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (Fa. Holten. Allerød, DK) durchgeführt.

Zur Inkulturnahme wurden Aliquots von 1 ml eingefrorener, in Cryoröhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) gelagerter Zellsuspension bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Hiernach wurde die Zellsuspension in Gewebekulturflaschen mit Filterdrehverschluß und einer Bodenfläche von 175 cm² (Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt, welche bereits mit 20 ml, auf 37°C vorgewärmtem Nährmedium (Zusammensetzung s. Tab. 3.2) beschickt waren. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert in einer humidifizierten Atmosphäre mit einem Anteil von 5% CO₂ in der Luft (CO₂-Begasungsbrutschrank CB 150, Binder, Tuttlingen). Innerhalb eines Zeitraumes von zwei bis sechs Tagen war der Zellrasen zur Konfluenz gewachsen.

Volumen (ml)	Bestandteil	Endkonzentration
500	Nutrient mixture F-12 Ham	
50	fetales Kälberserum (FKS)	10%
5	Penicillin/ Streptomycin	100 Einheiten/ml; 0,1 mg/ml
2,5	L-Glutamin-Lsg.	1 mM
1	Geniticindisulfat	0,2 mg/ml

Tab. 3.2: Zusammensetzung des Nährmediums für HEK- und CHO-Zellen; alle o.a. Bestandteile des Nährmediums wurden erworben von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen.

3.1.2.2 Vermehrung der Zellen

Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen einer Kulturflasche nach Bedarf auf zwei oder vier Kulturflaschen aufgeteilt. Dazu wurde zunächst das überstehende, verbrauchte Nährmedium mittels einer Vakuumpumpe (Absaugsystem AF 204, Fa. HLT, Bovenden) abgesaugt. Nun wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02% [Masse/Volumen]) und Klopfen gegen die Seitenwand der Kulturflasche abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde nach Zugabe von 3 ml Nährmedium in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen (Polypropylen, Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt und 5 min. bei 4°C und 1800 Upm zentrifugiert (Zentrifuge: Allegra 64R, Beckman Coulter, CA, USA). Das erhaltene Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes in frischem Nährmedium resuspendiert (Minischüttler MS1, Ika Labortechnik, Staufen) und auf die einzelnen Kulturflaschen, die vorher mit jeweils 20 ml Nährmedium beschickt worden waren, verteilt.

3.1.2.3 Ganzzellsuspension

Wie bereits unter Kap. 3.1 ausgeführt, wurden für die Bindungsversuche ausschließlich Ganzzellsuspensionen verwendet, die unmittelbar vor einem geplanten Versuch hergestellt werden mußten, da sie aufgrund ihrer Zusammensetzung nicht gelagert, also eingefroren werden können. Hierbei würden die Bindungsstellen zerstört werden.

Zur Herstellung einer Ganzzellsuspension wurde zunächst, wie in Kap. 3.1.2.2 beschrieben, ein Zellpellet gewonnen, das nach Absaugen des Trypsin/EDTA-haltigen Überstandes, in 20 ml PBS-Puffer (s. Kap. 3.2.2.3) aufgenommen und resuspendiert wurde. Hiernach wurde erneut unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt und das Zellpellet letztlich in 12 ml Meßpuffer aufgenommen und resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde direkt für einen Bindungsversuch verwendet. Für einen Bindungsversuch an Glasfaserrundfiltern (s. Kap. 3.2.3.1) wurden zwei T-175-Kulturflaschen mit einem zu 90%iger Konfluenz gewachsenem Zellrasen verwendet, für die halbautomatische Versuchsdurchführung (s. Kap. 3.2.3.1) wurde eine T-175-Kulturflasche verwendet.

3.1.2.4 Einlagerung der Zellen

Analog der unter Kap. 3.1.2.2 beschriebenen Vorgehensweise wurde ein Zellpellet gewonnen, das in frischem Nährmedium resuspendiert wurde. Dieser Suspension wurden nun zehn Volumenprozent Dimethylsulfoxid zugesetzt, um beim Gefriervorgang die Bildung größerer, zellschädigender Kristalle zu verhindern. Pro Kulturflasche wurden vier Aliquota von 1 ml Zellsuspension auf Cryoröhrchen verteilt, zunächst bei -80°C eingefroren, und nach 24h in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

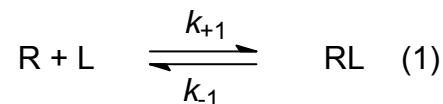
3.1.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Die zur Charakterisierung der eingesetzten Zelllinien erforderliche Bestimmung des jeweiligen Proteingehaltes der Ganzzellsuspensionen wurde nach den Methoden von Lowry et al. [57] und Bradford [58] bestimmt. Dazu werden blaue Säurefarbstoffe, welche auch als Coomassie-Brilliantblau bezeichnet werden, eingesetzt. Das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliantblau G-250 verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen von 465 zu 595 nm. Dafür wird eine Komplexbildung von Farbstoff und Protein verantwortlich gemacht, die auf einer Stabilisierung der anionischen, unprotonierten Form des Farbstoffes beruht. Bovines Serumalbumin (BSA) diene hier als Standard. Zur Aufnahme der UV-Spektren diene ein DU-640 Spektrophotometer der Firma Beckmann (CA, USA).

3.2 Radioligandbindungsstudien

3.2.1 Theoretische Grundlagen

In den nachfolgend beschriebenen Experimente wird die Bindung eines Radioliganden L an die Bindungsstelle eines entsprechenden Rezeptors R im Gleichgewicht untersucht:



Gleichung (1) ist anwendbar auf ein isoliertes System, indem L einen kompetitiven Antagonisten (oder Kanalblocker) repräsentiert, der die Struktur des Rezeptors nicht signifikant verändert. Sie gehorcht prinzipiell dem Massenwirkungsgesetz.

k_{+1} und k_{-1} sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation bzw. die Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes RL. Verlaufen beide Reaktionen gleich schnell, befindet sich das System im Gleichgewicht. Den Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten, bzw. – entsprechend dem Massenwirkungsgesetz – des Produktes der Konzentrationen der Edukte R und L und der Konzentration des Produktes RL, bezeichnet man als die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D :

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (2)$$

Aus Gleichung (2) wird deutlich, daß die Dissoziationskonstante K_D als Maß für die Affinität eines Liganden zum Rezeptor gelten kann. Der K_D -Wert steht für die Konzentration an freiem Ligand, bei der die Hälfte der Rezeptoren besetzt ist, also:

$$K_D = [L]_{0,5} \quad (3)$$

Je höher der Wert für K_D ist, desto geringer ist die Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes, und damit umso niedriger ist die Affinität eines Liganden zum Rezeptor. Den Kehrwert von K_D bezeichnet man als die Gleichgewichts-assoziationskonstante K_A .

Da im beschriebenen System nur eine begrenzte Anzahl freier Rezeptoren und damit Bindungsstellen zur Verfügung steht, ist die spezifische Bindung eines Radioliganden an einen Rezeptor sättigbar. Die ebenfalls fast immer zu beobachtende

unspezifische Bindung steigt jedoch linear mit der Konzentration des freien Liganden [L]. Sie kann auf verschiedenen Effekten beruhen, wie z.B. der Bindung des Liganden an andere Stellen im Gewebe (Rezeptoren, Enzyme, Transporter etc.), oder etwa an einen Filter. Weiter kommen die Aufnahme des Liganden in Membranen oder in die intakte Zelle sowie eine unvollständige Trennung des freien Liganden vom Rezeptor-Ligand-Komplex als Ursache der unspezifischen Bindung in Frage.

Betrachtet man nur die spezifische Bindung, so setzt sich diese zusammen aus der Konzentration an freien Rezeptoren [R] und Rezeptor-Ligand-Komplex [RL]:

$$B_{\max} = [R] + [RL] \quad (4)$$

B_{\max} steht hier für die maximale Bindungskapazität, also die Menge an Ligand - in unserem Fall auch an Radioaktivität - die maximal an die zur Verfügung stehende Menge an freien Rezeptoren gebunden werden kann. Die spezifische Bindung ist also sättigbar!

Durch Einsetzen von Gleichung (4) in Gleichung (2) erhält man die Sättigungs-isotherme nach *Hill-Langmuir* :

$$[RL] = \frac{B_{\max} [L]}{K_D + [L]} \quad (5)$$

Gleichung (5) beschreibt die Zunahme der Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes [RL] in Abhängigkeit von der Konzentration des freien Liganden [L] bis zur Sättigung aller freien Rezeptoren. Die unspezifische Bindung sollte im Idealfall vollkommen unabhängig sein von der spezifischen Bindung, so daß die Gesamtaufnahme an Radioligand durch das Gewebe einfach durch die Summe aus beiden gebildet wird. Unter der Annahme, daß die unspezifische Bindung eine lineare Funktion der Konzentration des freien Liganden ist, so ist die gemessene Bindung gegeben durch:

$$[RL] = \frac{B_{\max} [L]}{K_D + [L]} + c \cdot [L] \quad (6)$$

c ist hier eine Konstante.

In der Praxis wird die spezifische und unspezifische Bindung gemessen über eine Konzentrationsreihe von $[L]$, die eine Sättigung der spezifischen Bindung erlaubt.

Die Bestimmung der oben beschriebenen Modellparameter K_D und B_{\max} erfolgt nach Aufnahme der Daten durch Auftragen der Menge an gebundenem Radioliganden als Funktion der Radioligandkonzentration (Sättigungsexperimente) oder der Inhibitor-konzentration (Kompetitionsexperimente).

Es ist üblich, Linearisierungs-Transformationen der Bindungskurven einzusetzen, um erstmals die Bindungsparameter abzuschätzen. Der *Scatchard Plot* ist eine Möglichkeit, diese Linearisierung der Bindungskurven durchzuführen. Die *Langmuir'* sche Sättigungsisotherme wandelt sich dabei in folgende Geradengleichung um:

$$\frac{B}{L} = \frac{B_{\max}}{K_D} - \frac{B}{K_D} \quad (7)$$

Der *Scatchard Plot* [59] ist $B/[L]$ auf der y-Achse gegen B auf der x-Achse. Wenn die Gleichung anwendbar ist (d.h. es handelt sich bei der Bindung um eine einfache bimolekulare Interaktion), fallen die Meßwerte auf eine gerade Linie, wobei K_D dem negativen Kehrwert der Geradensteigung entspricht und B_{\max} sich aus dem y-Achsenabschnitt ergibt. Ungerade, gebogene *Scatchard-Plots* deuten auf eine positive oder negative Kooperativität oder die Anwesenheit anderer Bindungsstellen, wie z.B. Rezeptorsubtypen, mit anderen Affinitäten für den Liganden.

Es sollte darauf hingewiesen werden, daß eine lineare Regression beim *Scatchard Plot* mathematisch nicht vollkommen korrekt ist, da die x- und die y-Werte hier nicht völlig unabhängig voneinander sind. Eine lineare Regression des *Scatchard-Plots* überschätzt systematisch den K_D Wert und B_{\max} .

Weiterhin kann eine Abschätzung von K_D - und B_{\max} -Werten nur unter folgenden von *Bennet und Yamamura* [60] aufgestellten Bedingungen zu zuverlässigen Ergebnissen führen:

- Die Interaktion zwischen der einheitlichen Rezeptorpopulation und dem Liganden muß zum Zeitpunkt der Messung im Gleichgewicht sein und dem Massenwirkungsgesetz folgen.

- Maximal 10% der eingesetzten Ligandkonzentration $[L_T]$ dürfen im Rezeptor-Ligand-Komplex $[RL]$ gebunden vorliegen, damit die freie Ligandkonzentration $[L]$ mit der eingesetzten Ligandkonzentration $[L_T]$ gleichgesetzt werden darf. In diesem Sinne sollte B_{\max} 10% des K_D -Wertes des Radioliganden nicht übersteigen, da sich sonst die Wahrscheinlichkeit einer Unterschätzung der Affinität erhöht.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Berechnung des K_D - und B_{\max} -Wertes über eine Zwei-Punkte-Methode, bei der das Verhältnis von spezifischer und unspezifischer Bindung bei einer geringen und einer hohen Radioligandkonzentration bestimmt wird (wie bereits oben erwähnt steigt die unspezifische Bindung mit der Ligandkonzentration $[L]$ linear an, während die spezifische Bindung sättigbar ist). Die Berechnung erfolgte also mit Hilfe einer verkürzten, aus zwei Punkten bestehenden Sättigungsisotherme.

Die *Langmuir'sche* Sättigungsisotherme (Gleichung 5) nimmt hierbei für die beiden Radioligandkonzentrationen folgende Formen an:

$$[RL]_1 = \frac{B_{\max} \times [L]_1 / K_D}{1 + [L]_1 / K_D} \quad (8a)$$

$$[RL]_2 = \frac{B_{\max} \times [L]_2 / K_D}{1 + [L]_2 / K_D} \quad (8b)$$

Die Berechnung von B_{\max} wird möglich durch Auflösen der beiden Gleichungen nach $1/K_D$, Gleichsetzen und Umformen:

$$B_{\max} = \frac{[RL]_1 \times [RL]_2 \times ([L]_2 - [L]_1)}{[L]_2 \times [RL]_1 - [L]_1 \times [RL]_2} \quad (9)$$

Der nun erhaltene Wert für B_{\max} kann schließlich in die Gleichung der Sättigungsisotherme (Gleichung 8) eingesetzt werden, und nach Umformen kann nach *Lazareno und Birdsall* [61] der K_D -Wert berechnet werden:

$$K_D = \frac{[L] \times (B_{\max} - [RL])}{[RL]} \quad (10)$$

Der mit Hilfe der Zwei-Punkte-Methode bestimmte K_D -Wert der Dopamin-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien konnte nun eingesetzt werden als Konstante zur K_i -Wert-Berechnung als Maß für die Affinität der eingesetzten - in dieser Arbeit beschriebenen - Testsubstanzen.

Die Affinitäten der Testsubstanzen wurden bestimmt durch Konkurrenzexperimente mit einem Inhibitor, wie sie oft in der pharmazeutischen Forschung angewandt werden, da Sättigungsexperimente aufgrund der nicht vorhandenen markierten Testsubstanzen nicht durchführbar sind. In Konkurrenzexperimenten kann jedoch ein "kalter" Ligand zusammen mit einem bekannten Radioliganden als Konkurrent um die Bindungsstelle zum Einsatz kommen.

Man unterscheidet zwischen einer homologen und einer heterologen Konkurrenz.

Bei der homologen Konkurrenz handelt es sich um ein Inhibitionsexperiment, bei dem Radioligand und Inhibitor strukturell identisch sind und kompetitiv an einem Rezeptor interagieren. Hierbei bleibt die Konzentration des Radioliganden konstant bei steigender Konzentration des nicht markierten Kompetitors.

Die heterologe Konkurrenz hingegen ist ein kompetitives Experiment, bei dem sich Radioligand und Inhibitor strukturell voneinander unterscheiden. Sie dient zur Bestimmung der Affinität des Inhibitors zum Rezeptor, ausgedrückt als Gleichgewichtskonstante K_i , wenn die im Zusammenhang mit Gleichung (12) genannten Voraussetzungen erfüllt sind.

Wird die Radioligandbindung in Abhängigkeit von der Konzentration des "kalten" Liganden halblogarithmisch aufgetragen, so erhält man einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Dieser wird einer nicht-linearen Regressionsanalyse unterworfen, der die *Hill*-Gleichung [62] zugrunde liegt:

$$\frac{B_{\text{ges}}}{B_{\max} - B_{\text{ges}}} = \frac{[L]}{K_D} \quad (11)$$

Dies kann mittels verschiedener Softwareanwendungen schnell durchgeführt werden (z.B. Graphpad Prism ®). Beim sog. *Hill-Plot* wird nun $\log (B_{\text{ges}} / (B_{\max} - B_{\text{ges}}))$ gegen

$\log [L]$ aufgetragen. Im Idealfall erhält man eine gerade Linie mit einer als *Hill-Koeffizienten* n_H bezeichneten Kurvensteigung von 1. In diesem Fall kann von einer Kompetition von Radioligand und Inhibitor an einer einheitlichen Rezeptorpopulation ausgegangen werden. Ein Wert größer als 1 kann eine positive Kooperativität, also eine Erhöhung der Affinität durch bereits gebundene Ligandmoleküle bedeuten. Umgekehrt kann eine Steigung kleiner als 1 eine negative Kooperativität bedeuten. Denkbar ist aber auch das Vorliegen weiterer Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten zum untersuchten Liganden.

Den Wendepunkt der sigmoidalen Kurve bezeichnet man als IC_{50} -Wert. Dieser entspricht der Konzentration des Inhibitors, welcher die spezifische Bindung des Radioliganden auf 50% ihres Wertes in Abwesenheit des Inhibitors reduziert.

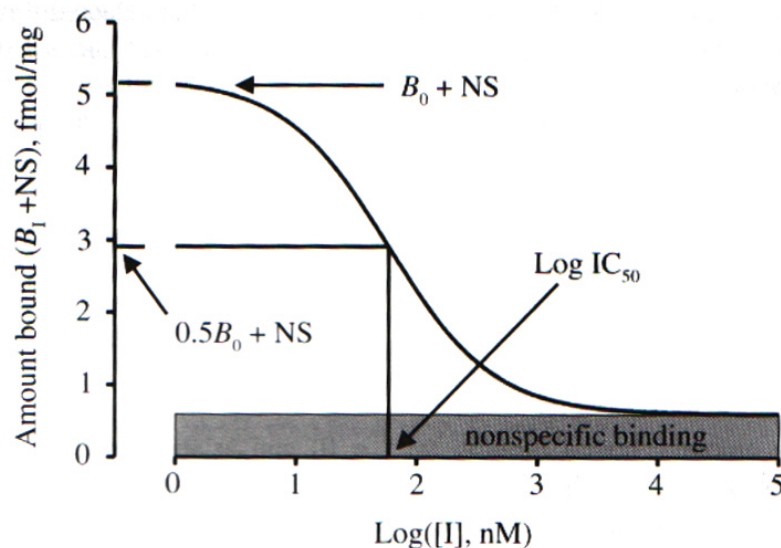


Abb. 3.1: Darstellung eines Kompetitionsexperimentes: Eine feste Konzentration eines Radioliganden – in Abwesenheit eines Inhibitors – bewirkt die spezifische Bindung B_0 . Die spezifische Bindung in Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors ist als B_1 bezeichnet. Die unspezifische Bindung wird als konstant angenommen. Die Konzentration des Inhibitors, die die spezifische Bindung um 50% reduziert, wird als IC_{50} bezeichnet. (Aus: J.C. Foreman & T. Johansen: *Textbook of Receptor Pharmacology*, CRC Press, 2nd edition, 2003)

Beträgt die Kurvensteigung $n_H = 1$, kann nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes gemäß *Cheng und Prusoff* [63] aus dem ermittelten IC_{50} -Wert, welcher noch von der Konzentration des Radioliganden $[L]$ abhängig ist, die davon unabhängige Gleichgewichtskonstante K_i als Maß für die Affinität des Inhibitors berechnet werden. Dazu müssen die Radioligandkonzentration $[L]$ und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D bekannt sein:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (12)$$

K_i ist eine thermodynamische Gleichgewichtsgröße, die angibt, welcher Anteil des Liganden im Mittel an das Protein gebunden ist. K_i hat die Dimension einer Konzentration, mit der Einheit mol/l (M). Bei einer homologen Kompetition sind Radioligand und Inhibitor strukturidentisch. In diesem Fall vereinfacht sich Gleichung (12) zu:

$$K_D = IC_{50} - [L] \quad (13)$$

De Blasi et al [64] stellten eine Gleichung zur Berechnung der vorhandenen Bindungsstellen B_{max} aus Gleichung (12) auf:

$$B_{max} = \frac{B_{spez.} \times IC_{50}}{[L]} \quad (14)$$

$B_{spez.}$ steht in dieser Gleichung für die spezifische Radioligandbindung in Abwesenheit eines Inhibitors (Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe).

3.2.2 Materialien

3.2.2.1 Radioliganden

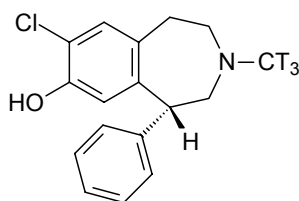
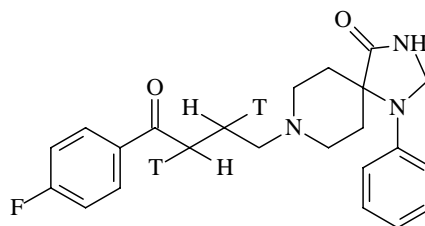
Für die Gleichgewichtsbindungsexperimente wurden zwei Radioliganden ausgewählt, die standardmäßig in der Literatur verwendet werden. [21, 65, 66] Die Radioliganden sollten für die jeweiligen Rezeptorsubtypen sowohl eine hohe Affinität als auch eine ausreichende Selektivität aufweisen. Ferner wurden am Rezeptor antagonistisch wirkende Radioliganden ausgewählt, da - wie insbesondere am D_2 -Rezeptor nachgewiesen wurde [67] - Agonisten als Radioliganden die Bildung des sog. "high affinity agonist (HiAg) state" fördern, also die Rezeptorkonformation in eine "aktive Form" verwandeln, zu der die zu testenden Liganden - Agonisten wie Antagonisten - gänzlich andere Affinitäten aufweisen können.

Zur Affinitätsbestimmung an Subtypen der D_1 -Rezeptorfamilie (D_1 , D_5) wurde das von der Firma Schering entwickelte [3H]SCH23390 (**70**) verwendet. Die Substanz weist am D_1 -Rezeptor einen K_i -Wert von ~0,2 nM, am D_{2L} -Rezeptor einen K_i -Wert

von ~1100 nM auf [68]. Die spezifische Aktivität betrug je nach Charge zwischen 71 und 83 Ci/mmol.

Für die Versuche an Subtypen der D₂-Rezeptorfamilie (D_{2L}, D₃, D_{4.4}) wurde [³H]Spiperon (**71**) verwendet. Die Substanz weist am D₁-Rezeptor einen K_i-Wert von ~350 nM, am D_{2L}-Rezeptor einen K_i-Wert von ~0,06 nM auf [68]. Die spezifische Aktivität betrug je nach Charge zwischen 97 und 106 Ci/mmol.

Beide Radioliganden wurden von der Firma Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK) bezogen.

**70****71**

3.2.2.2 Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden sowohl in dieser Arbeit beschriebene Verbindungen, als auch andere, von Mitgliedern des Arbeitskreises dargestellte Verbindungen verwendet.

Die Beschreibung der Synthese und die physikalischen und spektroskopischen Eigenschaften der in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen sind dem synthetischen Teil (Kap. 2 und 9) zu entnehmen.

Weitere Testsubstanzen wurden von den Herren Patrick Mohr [56, 69] und Christoph Enzensperger [70, 71] aus unserem Arbeitskreis synthetisiert.

3.2.2.3 Reagenzien und Puffer

Als Meßpuffer wurde ein in der Literatur von Mierau *et al* [72] beschriebener Puffer gewählt, der auch schon bei anderen Versuchen mit Testsubstanzen aus dem Arbeitskreis eingesetzt wurde, so daß ein Vergleich der zu messenden Bindungsdaten mit solchen aus der Literatur möglich wurde [27, 72].

Dieser Meßpuffer setzte sich zusammen aus einer Lösung von 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (TRIS-HCl), (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 5mM

Magnesiumchlorid (VWR international, Darmstadt) in Aqua dest., die mit 0,1N HCl (Fisher Scientific, Schwerte) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde.

Als isotoner Waschpuffer wurde ein sog. PBS Puffer (Phosphate buffered saline) verwendet, der sich aus 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 8,1 mM Natriumhydrogenphosphat und 1,4 mM Kaliumhydrogenphosphat (alle Chemikalien von VWR international, Darmstadt) in Aqua dest. zusammensetzt. Auch dieser Puffer wurde mit 0,1N HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Die Testsubstanzen wurden auf 0,1 mg genau eingewogen (Präzisionswaage, Denver Instruments, USA) und in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst (Fisher Scientific, Schwerte).

Aus dieser Stammlösung wurde eine wäßrige 10µM Lösung hergestellt, die zum Erstellen der Verdünnungsreihen diente.

3.2.3 Versuchsdurchführung

Die Gleichgewichtsbindungsversuche wurden aufgrund unterschiedlicher instrumenteller Ausstattung in verschiedenen Labors, in denen die Versuche durchgeführt wurden, mit Hilfe zweier Methoden durchgeführt. Die Methoden unterschieden sich im wesentlichen in der Filtrationsart. Zum einen kam ein "*manuelles Verfahren*" an Glasfaserrundfiltern (s. Kap. 3.2.3.1) zum Einsatz, zum anderen wurde mit Hilfe eines Harvesters halbautomatisch filtriert (s. Kap. 3.2.3.2). Die letztere Methode ermöglichte sowohl eine schnellere Versuchsdurchführung als auch die Einbeziehung einer höheren Anzahl von Testsubstanzen in einem Bindungsversuch. Zum Nachweis der Äquivalenz der Versuchsergebnisse beider Methoden wurde ein Vergleichsexperiment durchgeführt, bei dem der K_i -Wert der in der Einleitung beschriebenen Substanz LE 300 (s. Kap. 1.5) am hD_1 -Rezeptor bestimmt wurde. Das manuelle Verfahren mit Glasfaserrundfiltern lieferte einen K_i -Wert von 2,3 nM, das halbautomatische Verfahren einen K_i -Wert von 1,9 nM. Die mittlere Abweichung vom Mittelwert liegt damit unter zehn Prozent und somit in einem Bereich, der auch bei Versuchen, die nach nur einer der Methoden wiederholt wurden, beobachtet werden konnte (s. Kap. 4).

Mit jeder Testsubstanz wurden zwei Arten von Messungen durchgeführt. Zunächst wurde in einem Schnellscreening das Ausmaß der Affinität abgeschätzt. Hierzu wurde neben der Bestimmung der Gesamt- und unspezifischen Bindung die Verdrängung des Radioliganden bei nur einer Konzentration der Testsubstanz von

10 μM bestimmt. Mit Hilfe dieser Größe wurde die prozentuale Abnahme der am Rezeptor gebundenen Radioaktivität berechnet. Lag diese bei über 70 %, wurde der K_i -Wert bestimmt. Dies geschah mit Hilfe einer Reihe unterschiedlicher Endkonzentrationen der Testsubstanzen; in der Regel 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001 μM . Bei hochaffinen Substanzen wurden entsprechend noch verdünntere Konzentrationen ergänzt, bei weniger affinen Substanzen wurden zusätzlich höhere Konzentrationen eingesetzt. Um genaue Aussagen über die Selektivität der Affinität einer Testsubstanz machen zu können, wurde auch für Testsubstanzen, die eine Abnahme der gebundenen Radioaktivität von unter 70% bei einer Konzentration von 10 μM zeigten, der K_i -Wert bestimmt.

Die Gesamtbindung des Radioliganden wurde durch Zugabe von Meßpuffer statt der Testsubstanzlösung bestimmt. Die unspezifische Bindung des Radioliganden wurde bei Versuchen mit der D_1 -Rezeptorfamilie mit Hilfe von Fluphenazin in einer Endkonzentration von 10 μM bestimmt. Bei Experimenten mit der D_2 -Rezeptorfamilie wurde Haloperidol in einer Endkonzentration von 1 μM verwendet. Beide Liganden hatten in diesem Fall eine vollständige Besetzung der spezifischen Bindungsstellen zur Folge.

Alle K_i -Wert-Bestimmungen wurden, wenn im Ergebnisteil nicht anders beschrieben, im Triplikat und zweifach mit zwei voneinander unabhängigen Verdünnungsreihen bestimmt. Es wurde der Mittelwert der K_i -Werte, sowie die mittlere Abweichung vom Mittelwert (MITTELABW) berechnet (s. Kap. 4).

3.2.3.1 Durchführung mit Glasfaserrundfiltern

Die Versuchsansätze wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße aus Polyethylen mit einem Volumen von 1,5 ml (Greiner bio-one, Frickenhausen) pipettiert. Diese wurden zuvor zur Herabsetzung der unspezifischen Bindung, verursacht durch Bindung der Liganden an die Gefäßoberfläche, mit einem Silanisierungsreagenz (Sigmacote®, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) behandelt. Dabei handelt es sich um ein chloriertes Organosiloxan in Heptan.

Die Versuchsansätze setzten sich wie folgt zusammen (Ansatzgrösse: 1,1 ml):

Volumen	Bestandteil	Endkonzentration
690 µl	Meßpuffer (50 mM Tris-HCl, 5mM MgCl, pH 7,4)	
110 µl	Testsubstanz in Aqua dest. bzw. Meßpuffer zur Bestimmung der Gesamtbindung bzw. entsprechender Inhibitor zur Bestimmung der unspezi- fischen Bindung(Fluphenazin bzw. Haloperidol)	s. Kap. 3.2.3
200 µl	Ganzzellsuspension	variabel* (s. Kap. 3.1.2.3)
100 µl	Radioligand in Aqua dest. [³ H] SCH23390: [³ H] Spiperon:	~ 0,25 nM ~ 0,35 nM

Tab. 3.3: Versuchsansatz bei Durchführung mit Glasfaserrundfiltern, * Die Zellsuspension darf nur so hoch konzentriert sein, daß max. 10% des Radioliganden gebunden wird.

Die Bestandteile wurden in der o. a. Reihenfolge in die Reaktionsgefäße pipettiert, so daß nach Zugabe des Radioliganden die Gleichgewichtseinstellung am Rezeptor erfolgen konnte. Zu diesem Zweck wurden die Versuchsansätze auf einem Minischüttler (Ika Labortechnik, Staufen) etwa 20sec. durchmischt und dann in ein Wasserschüttelbad (GFL 1083, Ges. für Labortechnik mbH, Burgwedel) gegeben, in dem sie für 90 min. bei 27°C inkubiert wurden. Nach der Hälfte und nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze noch einmal auf dem Minischüttler durchmischt, um eine homogene Verteilung der Suspensionspartikel sicher zu stellen. Den Ansätzen wurde nun genau 1 ml entnommen und über Glasfaserrundfilter (Nr. 6, Schleicher & Schüll, Dassel) vakuumfiltriert. Hiernach wurden die Filter sofort zweimal mit jeweils 5 ml eisgekühltem Wasser gewaschen (max. Dauer des Waschvorganges: 15-20 sec.). Diese Vorgehensweise sollte eine möglichst vollständige Trennung der Zellen von der Lösung und von ungebundenen Anteilen des Radioliganden ermöglichen, ohne daß jedoch die Rezeptor-Ligand-Komplexe, bedingt durch die Verdünnung der Lösung, abdissoziieren konnten.

Die Filter wurden 24h vor Versuchsbeginn in eine 0,25 %ige Polyethyleniminlösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingelegt, um den Wert der unspezifischen Bindung, verursacht durch Bindung des Radioliganden an die Filteroberfläche, zu reduzieren.

Die Filter wurden nun in Polyethylen-Szintillationsgefäße überführt (20 ml, Ratiolab, Dreieich) und mit 5 ml Ready Protein® Szintillationscocktail (Beckman Coulter, CA, USA) versetzt. Luftblasen, die den Kontakt des Cocktails mit den organischen Bestandteilen zwecks deren Auflösung verhinderten, wurden herausgeklopft. Die Messung der membrangebundenen Radioaktivität erfolgte in einem Flüssigszintillationszähler (LS 6000 SC, Beckman Coulter, CA, USA) nach einer Wartezeit von 60 min., um etwaige nicht von der Probe stammende Lumineszenz abklingen zu lassen. Gemessen wurden bei einer Zählausbeute von ca. 60% die Zerfälle pro Minute (dpm), die Zähldauer pro Gefäß betrug drei Minuten.

Zur Bestimmung der Radioligandkonzentration wurde bei jedem Experiment gleichzeitig ein Kontrollwert gemessen. Die Probe hierfür wurde durch Pipettieren des gleichen Volumens an Radioligandlösung wie im Versuchsansatz in ein Szintillationsgefäß (s.o.) und Zusatz von 5 ml Szintillationscocktail (s.o.) erhalten und im selben Flüssigszintillationszähler wie oben vermessen. Die bestimmte Radioligandkonzentration diente später zur Berechnung des K_i -Wertes (s. Kap. 3.3).

3.2.3.2 Halbautomatische Durchführung mit Harvester

Die Bindungsexperimente mit Hilfe dieser Methodik erfolgten unter Verwendung von Mikrotiterplatten (Deep well plates, Greiner bio-one, Frickenhausen), die mit 96 Vertiefungen mit einem jeweiligen Volumen von 1,2 ml ausgestattet waren.

Die Abtrennung der membrangebundenen Radioaktivität erfolgte hier mittels eines Harvesters 96® (Mach III, TOMTEC, CT, USA).

Bedingt durch die Größe der Mikrotiterplatten wurde die Ansatzgröße gegenüber dem manuellen Filtrationsverfahren (s. Kap. 3.4.1) halbiert.

Die Versuchsansätze setzten sich also wie folgt zusammen (Ansatzgröße: 550 µl):

Volumen	Bestandteil	Endkonzentration
345 µl	Meßpuffer (50 mM Tris-HCl, 5mM MgCl, pH 7,4)	
55 µl	Testsubstanz in Aqua dest. bzw. Meßpuffer zur Bestimmung der Gesamtbindung bzw. entsprechender Inhibitor zur Bestimmung der unspezifischen Bindung	s. Kap. 3.2.3

100 µl	Ganzzeilsuspension	variabel* (s. Kap. 3.1.2.3)
50 µl	Radioligand in Aqua dest.	
	[³ H] SCH23390:	~ 0,25 nM
	[³ H] Spiperon:	~ 0,35 nM

Tab. 3.4: Versuchsansatz bei Durchführung mit Harvester, * Die Zeilsuspension darf nur so hoch konzentriert sein, daß max. 10% des Radioliganden gebunden wird.

Die Bestandteile wurden auch hier in der o. a. Reihenfolge in die Reaktionsgefäße pipettiert, und zur Homogenisierung der Suspension auf einem Minischüttler (Ika Labortechnik, Staufen) etwa 20 sec. durchmischt. Zuvor wurde die Mikrotiterplatte jedoch mit Parafilm (American National Can®, IL, USA) abgedeckt. Die Inkubation erfolgte, wie in Kap. 3.2.3.1, bei 27°C über 90 min, jedoch mit Hilfe eines beheizbaren Schüttlers (Thermocycler comfort, Eppendorf, Wesseling). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze in der Mikrotiterplatte noch einmal für 90 sec. auf dem Minischüttler durchmischt und dann mittels des erwähnten Harvesters bei 3 psi über eine Filtermatte (Filtermat A, PerkinElmer Life Sciences, Wolznach), die 2h zuvor zur Minderung der unspezifischen Filterbindung in eine 0,25%ige Polyethyleniminlösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingelegt worden war, vakuumfiltriert. Dabei wurde ein voreingestelltes automatisches Programm des Harvesters angewandt, das über 5 Filtrations- und Spülzyklen sowohl eine wie in Kap. 3.2.3.1 beschriebene optimale Trennung der Zellen und Rezeptor-Ligand-Komplexe von der übrigen Lösung als auch ein intensives Auswaschen der Plattenvertiefungen ermöglichte. Danach wurde die Filtermatte entnommen und in einem Mikrowellengerät (MW 21, Clatronic, Kempen) bei 400 W für 3 min. getrocknet. Die Filtermatte wurde nun paßgenau in eine Zählkassette (Omni filter plates, PerkinElmer Life Sciences, Wolznach) überführt und es wurden auf jedes der 96 Felder der Filtermatte 50µl Microscint 20® Szintillationscocktail (PerkinElmer Life Sciences, Wolznach) pipettiert. Die Messung der membrangebundenen Radioaktivität erfolgte nun mit einem Top Count NXT® Microplate Scintillation Counter (Packard, Ct, USA). Auch bei diesen Experimenten wurde mittels eines Kontrollwertes die jeweilige Radioligandkonzentration bestimmt. Dies geschah wie unter Kap. 3.2.3.1 beschrieben.

3.2.4 Bestimmung der K_D -Werte

Die zur Charakterisierung der eingesetzten Zelllinien erforderliche Bestimmung des jeweiligen K_D -Wertes erfolgte mit Hilfe der bereits unter Kap. 3.2.1 beschriebenen Zwei-Punkte-Methode.

Hierzu wurde nach dem in Kap. 3.2.3.2 beschriebenen Verfahren sowohl die Gesamtbindung als auch die unspezifische Bindung des Radioliganden, jeweils in Gegenwart einer niedrigen und einer hohen Konzentration von diesem, bestimmt. Die Versuchsansätze setzten sich, wie in Tab. 3.4 beschrieben, zusammen.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde im Falle der den D_1 - bzw. D_5 -Rezeptor exprimierenden Zelllinien Fluphenazin in einer Endkonzentration $10\mu\text{M}$ eingesetzt, im Falle der den $D_{4.4}$ exprimierenden Zelllinien wurde Haloperidol in einer Endkonzentration von $1\mu\text{M}$ eingesetzt (s. auch Kap. 3.2.3). $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ wurde als Radioligand in einer Endkonzentration von $0,2$ und 4 nM für die D_1 - und D_5 -Rezeptor exprimierenden Zelllinien, $[^3\text{H}]\text{Spiperon}$ in einer Endkonzentration von $0,1$ und 2 nM für die den D_4 -Rezeptor exprimierenden Zelllinien verwandt.

3.3 Auswertung der Meßergebnisse

Die Auswertung der als Dreifachbestimmung durchgeführten Bindungsexperimente erfolgte mit Hilfe der Software Graph Pad Prism[®], Version 4.0 (Graph Pad[®] Software, CA, USA) nach Eingabe der vom Computer ausgedruckten Einzeldaten. Die Berechnung der Mittelwerte erfolgte automatisch, die Analyse der Daten erfolgte in halblogarithmischer Darstellung unter Annahme der im Programm voreingestellten Funktion "one site competition" anhand nicht-linearer Regression. Microsoft[®] Excel diente zur Tabellenkalkulation und zur Berechnung der Mittelwerte, der mittleren Abweichungen vom Mittelwert und der Standardabweichungen der einzelnen Experimente.

4 Pharmakologischer Teil – Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der eingesetzten Zelllinien

Die Proteinbestimmung und K_D -Wert-Bestimmung der eingesetzten Zelllinien ergab die in Tab. 4.1 dargestellten Werte.

Zelllinie	Proteinkonzentration [mg/ml]	B_{max} [fmol/mg Protein]	K_D [nM]
<i>[³H]SCH 23390</i>			
HEK-D ₁ -214	1,26	3139	0,19
HEK-D ₅ -505	1,54	6087	0,11
<i>[³H]Spiperon</i>			
CHO-D _{2L}	0,37	4261	0,77
CHO-D _{4.4}	0,94	6043	0,21

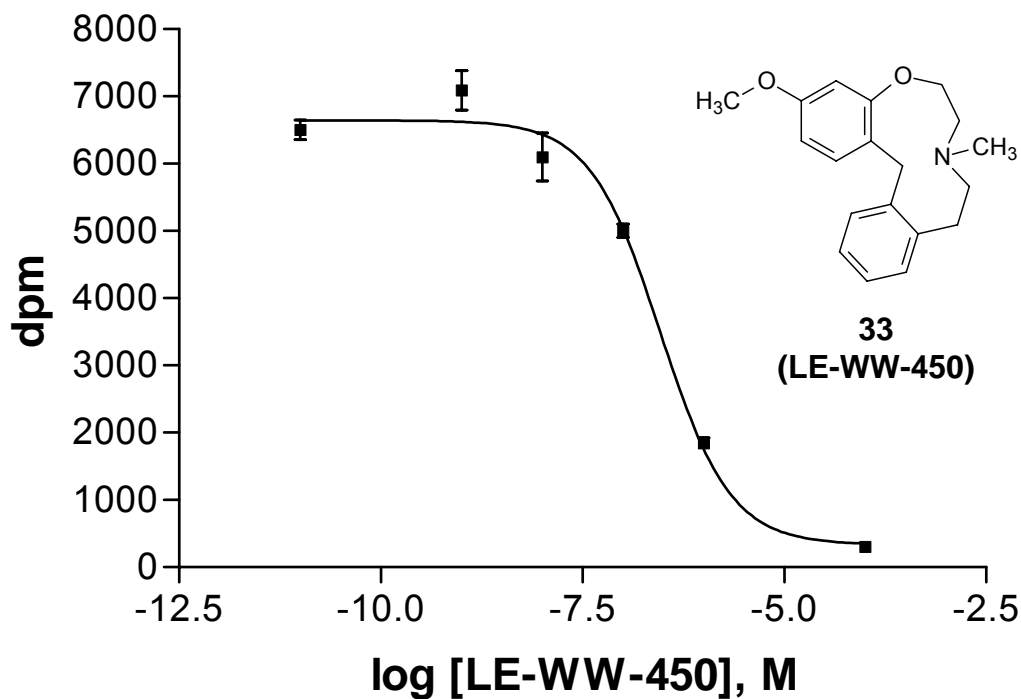
Tab. 4.1: Experimentell ermittelte Proteinkonzentrationen der eingesetzten Zelllinien, sowie B_{max} und K_D -Werte der Radioliganden (*[³H]SCH 23390* an D_1 - und D_5 -Rezeptoren, *[³H]Spiperon* an D_{2L} - und $D_{4.4}$ -Rezeptoren).

4.2 Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien

Im Folgenden sind die Ergebnisse der durchgeführten Radioligandbindungsstudien tabellarisch dargestellt (s. Tab. 4.3 bis 4.6). In die Versuche einbezogen wurden sowohl Substanzen, deren Synthesen in dieser Arbeit beschrieben sind, als auch von anderen Mitgliedern des Arbeitskreises hergestellte Verbindungen (s. auch Kap. 1.5). Den Ergebnissen dieses Screenings vorangestellt sind die nach der in Kap. 3.2.3 beschriebenen Methode ermittelten K_i -Werte des Standardliganden SCH 23390 und der Leitverbindung LE 300 am D_1 - und D_5 - Rezeptor im Vergleich zu Literatur-Bindungsdaten (s. Tab. 4.2). Die Affinität der Testsubstanzen an den einzelnen Dopamin-Rezeptorsubtypen ist zunächst angegeben als prozentuale Abnahme der rezeptorgebundenen Radioaktivität durch eine 10 μ M Lösung der Testsubstanz. In diesem Schnellscreening (s. Kap. 3.2.3) wird die am Rezeptor verbliebene Radioaktivität nach Inkubation mit der 10 μ M Testsubstanzlösung bzw. mit einer

10 μ M Fluphenazin- oder 1 μ M Haloperidollösung (unspezifische Bindung) gemessen. Zusätzlich wird die Gesamtbindung durch Zugabe einer äquivalenten Menge Meßpuffer zum Inkubationsansatz gemessen. Die Differenz der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung in dpm ergibt die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit eines kompetitiven Inhibitors. Anhand der nach Inkubation mit der Testsubstanz gemessenen verbliebenen Radioaktivität kann nun nach Abzug der unspezifischen Bindung die prozentuale Abnahme dieser spezifischen Bindung des Radioliganden einfach berechnet werden. Lag diese über 70%, wurde in der Regel eine Bestimmung des K_i -Wertes durchgeführt. Dies geschah nach dem in Kap. 3.2.3 beschriebenen Verfahren. Die Berechnung der K_i -Werte erfolgte durch die Software Graph Pad Prism[®] (s. Kap. 3.3) anhand des aus den Bindungsdaten generierten Kurvenverlaufes nach der Formel von *Cheng und Prusoff* [63], (Formel 12 in Kap. 3.2.1) aus dem ermittelten EC_{50} -Wert. Die neben dem K_D -Wert für diese Berechnung notwendige Konzentration des Radioliganden wurde bei jedem Bindungsversuch erneut bestimmt, indem man die Zählrate derselben Menge Radioligand wie im jeweiligen Versuchsansatz nach Zugabe von Szintillationscocktail bestimmt. Die Division dieses Wertes in dpm durch die spezifische Aktivität des Radioliganden, das Volumen des Reaktionsansatzes in ml und den Faktor 2220 ergibt die Konzentration des Radioliganden in nM. Wurden zwei voneinander unabhängige Bindungsexperimente durchgeführt, so ist der K_i -Wert als Mittelwert dieser beiden Bestimmungen \pm mittlere Abweichung vom Mittelwert (MABW) angegeben. Geht der berechnete K_i -Wert aus drei unabhängigen Versuchen hervor, so ist die Standardabweichung (STABW) angegeben.

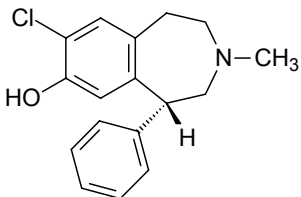
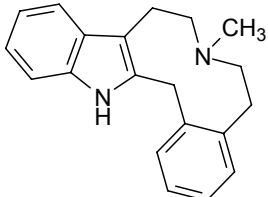
In der folgenden Abbildung sind anhand eines Beispiels (K_i -Wert-Bestimmung der Verbindung **33** (interne Chiffre: LE-WW-450) an CHO-D₂L-Zellen) die Bindungsdaten, der Kurvenverlauf und die Auswertung eines Bindungsexperimentes dargestellt (Abb. 4.1). Dabei werden von Graph Pad Prism[®] der EC_{50} -Wert und der K_i -Wert angegeben, ebenso die Werte des oberen und unteren Plateaus der Kurve (entsprechend dem Gesamtbindungsplateau und dem Plateau der unspezifischen Bindung) und die Standardabweichungen für diese Angaben. Weiter werden der Wertebereich des 95% Konfidenzintervalls für die o.a. Werte und Daten zur Güte der Anpassung angegeben.



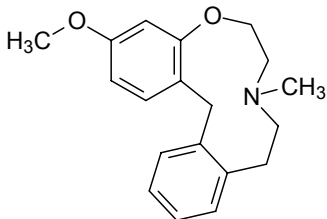
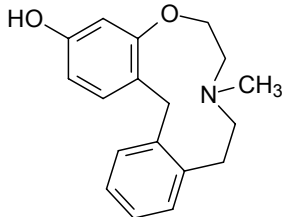
log [LE-WW-450], M	dpm		
	Y1	Y2	Y3
-4.0	288.0	321.0	297.0
-6.0	1695.0	1944.0	1899.0
-7.0	5025.0	5160.0	4824.0
-8.0	5562.0	5955.0	6780.0
-9.0	6504.0	7371.0	7398.0
-11.0	6213.0	6690.0	6612.0

One site competition	
Best-fit values	
BOTTOM	333.5
TOP	6644
LOGEC50	-6.535
EC50	2.9191e-007
KI	1.9716e-007
Ligand (Constant)	0.3700
Kd (Constant)	0.7700
Std. Error	
BOTTOM	226.6
TOP	143.3
LOGEC50	0.08478
95% Confidence Intervals	
BOTTOM	-149.5 to 816.5
TOP	6339 to 6949
LOGEC50	-6.715 to -6.354
EC50	1.9256e-007 to 4.4250e-007
KI	1.3007e-007 to 2.9888e-007
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	15
R ²	0.9776
Absolute Sum of Squares	2.6018e+006
Sy.x	416.5

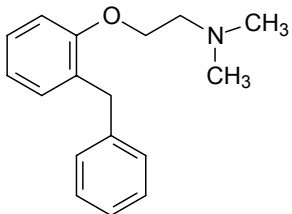
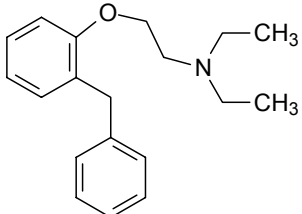
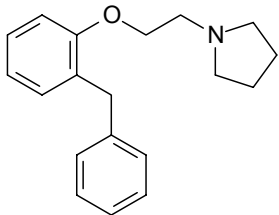
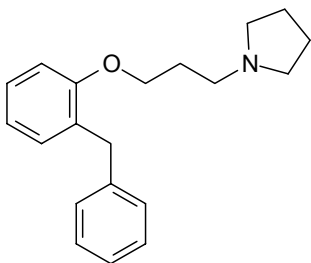
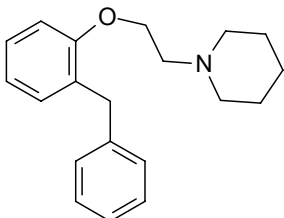
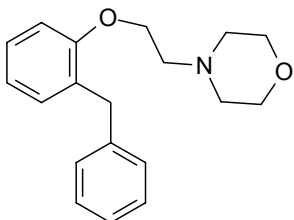
Abb. 4.1: Kurvenverlauf, Bindungsdaten und Ergebnisse des heterologen Kompetitionsexperimentes zwischen [³H] Spiperon und Verbindung **33** an D_{2L}-Rezeptoren aus Graph Pad Prism®, Version 4.00. Der Versuch wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt, die Fehlerbalken stellen den jeweiligen Standardfehler dar.

Strukturformel	Name	K _i -Wert [nM] Bindungsexperiment	K _i -Wert [nM] Literatur
	SCH 23390	D ₁ : 0,43 ± 0,09 D ₅ : 0,29 ± 0,02	D ₁ : 0,35 [20] D ₅ : 0,3 [20]
	LE 300	D ₁ : 1,9 ± 0,9	D ₁ : 4,9 ± 1,6 [25]

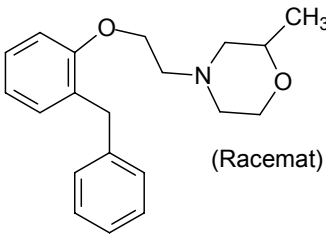
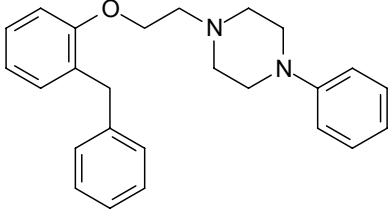
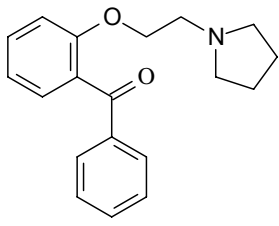
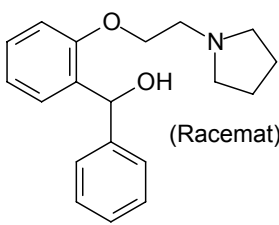
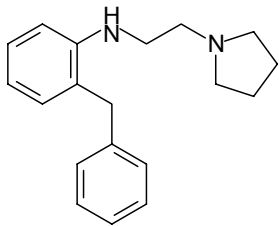
Tab. 4.2: Vergleich der K_i-Werte des Standardantagonisten SCH 23390 und der Leitverbindung LE 300 aus den durchgeführten Bindungsexperimenten und aus Literaturangaben (Radioligandbindungsstudien an humanen, rekombinanten Rezeptoren). [73]

Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 µM Lösung	K _i -Wert [nM] ± MABW oder ± STABW (*)
	33 [LE-WW-450]	D ₁ : 97 D ₂ : 95 D ₄ : 93 D ₅ : 100	D ₁ : 35,5 ± 11,7 D ₂ : 158 ± 38 D ₄ : 546 ± 110* D ₅ : 1,8 ± 0,2
	40 [LE-WW-451]	D ₁ : 100 D ₂ : 90 D ₄ : 90 D ₅ : 100	D ₁ : 3,2 ± 0,8* D ₂ : 274 ± 0,5 D ₄ : 375 ± 106 D ₅ : 0,57 ± 0,1

Tab. 4.3: Bindungsdaten der Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene.

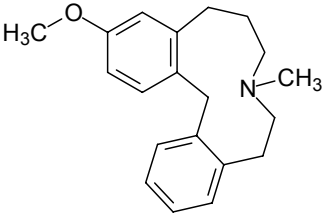
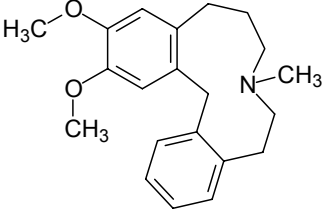
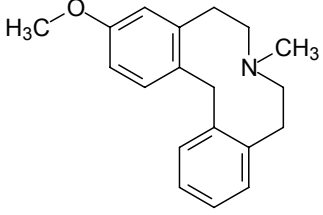
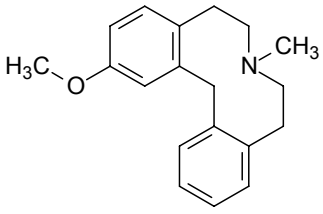
Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 µM Lösung	K _i -Wert [nM] ± MABW oder ± STABW (*)
	51 [LE-WW-452]	D ₁ : 90 D ₂ : 58 D ₄ : 50 D ₅ : 91	D ₁ : 343 ± 28,5 D ₂ : 2740 ± 415 D ₄ : 2765 ± 469 D ₅ : 414 ± 18
	52 [LE-WW-453]	D ₁ : 73 D ₂ : 60 D ₄ : 32 D ₅ : 89	D ₁ : 1959 ± 140 D ₂ : 2024 ± 7 n.b. n.b.
	53 [LE-WW-454]	D ₁ : 90 D ₂ : 34 D ₄ : 47 D ₅ : 98	D ₁ : 379 ± 157 D ₂ : 10455 ± 245 D ₄ : 1428 ± 198 D ₅ : 951 ± 334
	59 [LE-WW-459]	D ₁ : 98 D ₂ : 61 D ₄ : 24 D ₅ : 96	D ₁ : 113 ± 3 D ₂ : 1006 ± 342 D ₄ : 1261 ± 84 D ₅ : 113 ± 26
	54 [LE-WW-455]	D ₁ : 91 D ₂ : 73 D ₄ : 64 D ₅ : 99	D ₁ : 33,7 ± 0,4 D ₂ : 1015 ± 516 D ₄ : 4476 ± 2496 D ₅ : 43 ± 5
	55 [LE-WW-456]	D ₁ : 87 D ₂ : 13 D ₄ : 24 D ₅ : 82	D ₁ : 201 ± 98 D ₂ : 19305 ± 555 D ₄ : 6484 ± 462 D ₅ : 366 ± 8

Tab. 4.4: Bindungsdaten der offenkettigen Analoga der Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene.

Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 µM Lösung	K _i -Wert [nM] ± MABW oder ± STABW (*)
 (Racemat)	56 [LE-WW-457]	D ₁ : 73 D ₂ : 39 D ₄ : 37 D ₅ : 68	D ₁ : 1646 ± 429 D ₂ : 18160 ± 3020 n.b. n.b.
	57 [LE-WW-458]	D ₁ : 70 D ₂ : 41 D ₄ : 46 D ₅ : 90	D ₁ : 1480 ± 197 D ₂ : 4188 ± 302 n.b. D ₅ : 620 ± 255
	60 [LE-WW-460]	D ₁ : 51 D ₂ : 24 D ₄ : 11 D ₅ : 65	D ₁ : 1651 ± 458 D ₂ : 5317 ± 1038 n.b. n.b.
 (Racemat)	61 [LE-WW-461]	D ₁ : 73 D ₂ : 32 D ₄ : 11 D ₅ : 59	D ₁ : 2621 ± 1121 D ₂ : 6280 ± 1621 n.b. n.b.
	64 [LE-WW-462]	D ₁ : 51 D ₂ : 52 D ₄ : 20 D ₅ : 68	n.b. n.b. n.b. n.b.

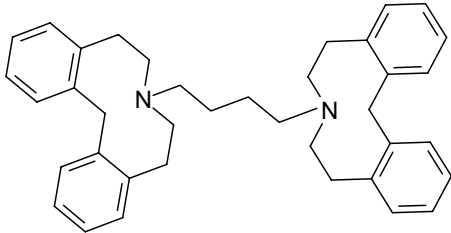
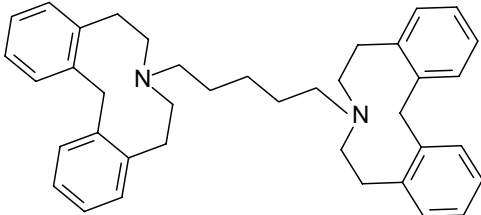
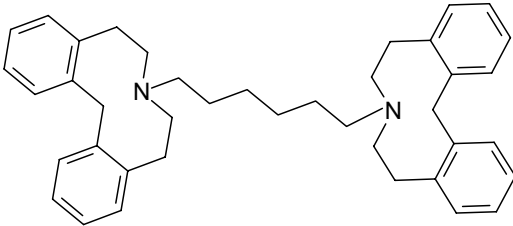
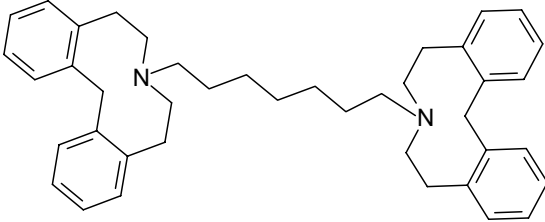
Fortsetzung **Tab. 4.4**

Die im Folgenden dargestellten Bindungsdaten der von anderen Mitgliedern des Arbeitskreises synthetisierten Verbindungen resultieren aus Bindungsversuchen nur an D₁- und D₂-Rezeptoren als Vertreter für die entsprechenden Subtypfamilien.

Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern] [Hersteller, Literatur]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 µM Lösung	K _i -Wert [nM] ± MABW oder ± STABW (*)
	13 [LE-CE-476] [Enzensperger, 70, 71]	D ₁ : 99 D ₂ : 91	D ₁ : 20,4 ± 9,3 D ₂ : 24,4 ± 0,3
	13 [LE-CE-475] [Enzensperger, 70, 71]	D ₁ : 76 D ₂ : 67	D ₁ : 649 ± 158 D ₂ : 1028 ± 461
	12 [LE-PM-425] [Mohr, 56,69]	D ₁ : 97 D ₂ : 99	D ₁ : 28,5 ± 9,7 D ₂ : 13 ± 9
	12 [LE-PM-429] [Mohr, 56,69]	D ₁ : 91 D ₂ : 94	D ₁ : 82 ± 30 D ₂ : 62 ± 5

Tab. 4.5: Bindungsdaten von Dibenz[d,g]-2-azacycloundecen- und Dibenz[d,g]azecinen.

Folgende K_i -Werte der dimeren Dibenz[*d,g*]azecine wurden ebenfalls nur an D_1 - und D_2 -Rezeptoren und in Einfachbestimmungen durchgeführt.

Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern] [Hersteller, Literatur]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 μ M Lösung	K_i -Wert [nM] \pm MABW oder \pm STABW (*)
	66 [LE-PM-430] [Mohr, 56]	D_1 : 21 D_2 : 57	D_1 : 52140 D_2 : 6357
	66 [LE-PM-431] [Mohr, 56]	D_1 : 63 D_2 : 71	D_1 : 4104 D_2 : 848
	66 [LE-WW-463] [Wittig]	D_1 : 73 D_2 : 62	D_1 : 5383 D_2 : 795
	66 [LE-WW-464] [Wittig]	D_1 : 48 D_2 : 56	D_1 : 5956 D_2 : 2219

Tab. 4.6: Bindungsdaten der dimeren Dibenz[*d,g*]azecine.

5 Diskussion

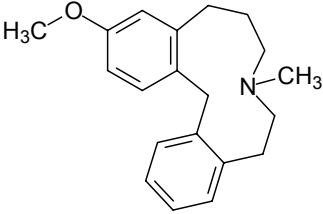
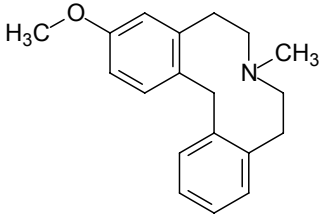
Aus den Ergebnissen der Radioligandbindungsstudien sollen in den folgenden Kapiteln allgemeine Struktur-Wirkungs-Beziehungen hinsichtlich der in Kap. 1.5 formulierten Fragestellungen abgeleitet werden. Dies geschieht anhand konkreter Beispiele, sowohl durch den Vergleich der Affinitätswerte von Substanzen einer untersuchten Substanzklasse, als auch durch den Vergleich der Ergebnisse von Vertretern verschiedener Substanzklassen.

Die gewonnenen Erkenntnisse aus diesen Versuchen werden – soweit möglich – mit Ergebnissen aus Screenings verglichen, die *Decker* [27], auch mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien, an einer großen Zahl potentieller, im Arbeitskreis hergestellter, Dopamin-Rezeptorliganden durchführte.

Die Ergebnisse des Schnellscreenings und der K_i -Wert-Bestimmungen zeigen, daß eine exakte Korrelation der aus beiden Verfahren gewonnen Ergebnisse nicht immer erkennbar ist. Der Grund könnte darin liegen, daß das Schnellscreening jeweils in Einfachbestimmungen durchgeführt wurde, die K_i -Wert-Bestimmungen in der Regel in Zweifachbestimmungen. Die Ergebnisse des Schnellscreenings gaben trotzdem zuverlässige Hinweise auf eine Affinität der Testsubstanzen zu dem untersuchten Rezeptorsubtyp. Bezüglich der ermittelten K_i -Werte muß auf teilweise sehr große Standardabweichungen bzw. mittlere Abweichungen vom Mittelwert hingewiesen werden. Da die Affinität der dimeren Dibenz[*d,g*]azecine (s. Tab. 4.6) nur in Einfachbestimmungen der K_i -Werte untersucht wurde, erscheint aus diesem Grund für die genauere Beurteilung dieser Verbindungen eine Mehrfach-Bestimmung sinnvoll.

5.1 Einfluß der Ringerweiterung bei Dibenz[*d,g*]azecinen auf die Affinität zu Dopamin-Rezeptorsubtypen

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse der Bindungsexperimente (s. auch Kap. 4.2) mit den Verbindungen **LE-CE-476** und **LE-PM-425**, die sich strukturell nur in der Größe des zentralen Ringsystemes unterscheiden, miteinander verglichen. Verbindung **LE-CE-476** weist dabei ein weniger rigides, elfgliedriges zentrales Ringsystem auf, indem eine der beiden Phenylethylamin-Partialstrukturen durch eine Phenylpropylamin-Struktur ersetzt ist.

Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern] [Hersteller, Literatur]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 μ M Lösung	K _i -Wert [nM] \pm MABW
	13 [LE-CE-476] [Enzensperger, 70, 71]	D ₁ : 99 D ₂ : 91	D ₁ : 20,4 \pm 9,3 D ₂ : 24,4 \pm 0,3
	12 [LE-PM-425] [Mohr, 56,69]	D ₁ : 97 D ₂ : 99	D ₁ : 28,5 \pm 9,7 D ₂ : 13 \pm 9

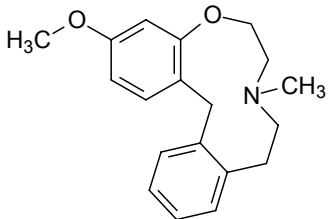
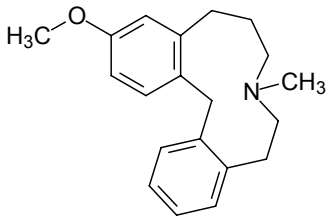
Tab. 5.1: Bindungsdaten des Dibenz-azecins LE-PM-425 und des Dibenz-aza-cycloundecens LE-CE-476.

Beide Testsubstanzen zeigen K_i-Werte am D₁- als auch am D_{2L}-Rezeptor im Bereich von etwa 20 nM. Es ist also eine ausgeprägte Affinität zu den zwei Vertretern der beiden Dopamin-Rezeptorfamilien festzustellen, beide Verbindungen zeigen jedoch keinerlei Selektivität zu einem der beiden Rezeptor-Subtypen.

- Eine Vergrößerung des zentralen Ringsystems der Dibenz[d,g]azecine um eine Methylengruppe in der oberen Ringhälfte und die damit verbundene geringere Rigidität hat keinen Einfluß auf die Affinität und Selektivität zu den untersuchten Rezeptorproteinen.

5.2 Vergleich der Bindungseigenschaften der elfgliedrigen Homoazecine hinsichtlich eines isosterischen Austausches einer Methylengruppe durch ein Sauerstoffatom

Der Einfluß eines in Position 5 im heterozyklischen Ringsystem der Dibenz-aza-cycloundecene vorhandenen Sauerstoffatoms soll anhand eines Vergleiches der Bindungsdaten des Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecens **33 (LE-WW-450)** und des Dibenz[d,g]-2-azacycloundecens **LE-CE-476** erläutert werden.

Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern] [Hersteller, Literatur]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 μ M Lösung	K _i -Wert [nM] \pm MABW oder \pm STABW (*)
	33 [LE-WW-450] [Wittig]	D ₁ : 97 D ₂ : 95 D ₄ : 93 D ₅ : 100	D ₁ : 35,5 \pm 11,7 D ₂ : 158 \pm 38 D ₄ : 546 \pm 110* D ₅ : 1,8 \pm 0,2
	13 [LE-CE-476] [Enzensperger, 70, 71]	D ₁ : 99 D ₂ : 91	D ₁ : 20,4 \pm 9,3 D ₂ : 24,4 \pm 0,3

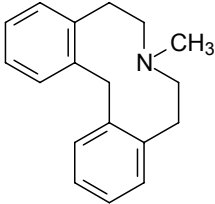
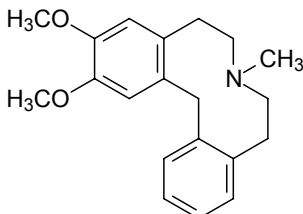
Tab. 5.2: Bindungsdaten eines Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecens und eines Dibenz[d,g]-2-azacycloundecens.

Die in Tab. 5.2 aufgeführten Bindungsdaten zeigen, daß beide Testsubstanzen Biostere am D₁-Rezeptor darstellen, d.h. ihre Bindungseigenschaften gleichen sich. Im Vergleich mit den für den D_{2L}- und D₄-Rezeptor ermittelten K_i-Werten ist eine leichte Selektivität des Oxa-azacycloundecens **LE-WW-450** zu den Subtypen der D₁-Rezeptorfamilie zu erkennen. Der durch die unterschiedlichen Bindungswinkel von Etherfunktion und Methylengruppe bedingte Konformationsunterschied, aber auch die veränderte elektronische Situation im aliphatischen Ringsystem durch den höheren –I-Effekt des Sauerstoffs gegenüber der Methylengruppe und die damit verbundenen Veränderungen im elektrostatischen Feld der Moleküle könnten ein Grund für die schlechtere Bindung zum D_{2L}- Rezeptor sein. Allerdings könnten nur genaue Untersuchungen bezüglich der Bindungsstelle der Liganden am D₁- bzw. D_{2L}-Rezeptor, wie z.B. Mutagenese-experimente oder QSAR-Studien hierüber sicher Aufschluß geben. Interessant erscheint die hohe Affinität der Verbindung **LE-WW-450** zum D₅-Rezeptor, die die Affinität zum D₁-Rezeptor um etwa den Faktor zwanzig übersteigt. Sie kann aufgrund fehlender Bindungsdaten des Aza-Homologs **LE-CE-476** und des Dibenz-azecins **LE-PM-425** (s. Tab. 5.3) an diesem Rezeptor jedoch nicht einem bestimmten Strukturmerkmal zugeordnet werden.

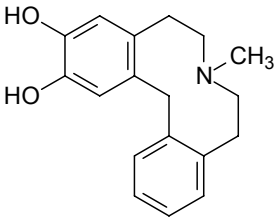
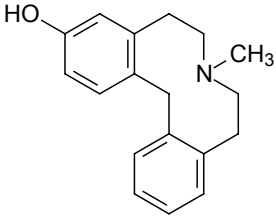
- *Der isosterische Austausch einer Methylengruppe in Position 5 des Dibenz[d,g]aza-cycloundecens gegen ein Sauerstoffatom hat keinen Einfluß auf die Bindung zum D₁-Rezeptor, führt aber zu einer leicht erhöhten Selektivität gegenüber dem D₂-Rezeptor. Verbindung **33** zeigt eine leichte Prävalenz der Bindungsaffinität zum D₅- gegenüber dem D₁-Rezeptorsubtyp.*

5.3 Vergleich der Bindungseigenschaften von methoxylierten und hydroxylierten Dibenz[d,g]azecinen und ihren elfgliedrigen Homologen

Eine mögliche Modifikation der Bindungseigenschaften der untersuchten Substanzen zu Dopamin-Rezeptoren, hervorgerufen durch eine Veränderung der elektronischen Struktur der ringannellierten Aromaten durch unterschiedliche Substituenten, soll diskutiert werden. Im Folgenden sind zunächst die Bindungsdaten der bereits von Decker [27] in Radioligandbindungsstudien untersuchten methoxylierten und hydroxylierten Dibenz[d,g]azecine dargestellt. Sie sollen dann hinsichtlich weiterer Struktur-Wirkungsbeziehungen mit den in dieser Arbeit ermittelten Bindungsdaten neuerer Dibenz-azecine und der homologen Dibenz-oxa-azacycloundecene und Dibenz-azacycloundecene verglichen werden.

Strukturformel	[Chiffre intern] [Hersteller, Literatur]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 µM Lösung	K _i -Wert [nM] ± MABW
	[LE-410] [Schweikert, 35]	D ₁ : 97 D ₂ : 98 D ₄ : 93 D ₅ : 91	D ₁ : 4,5 D ₂ : 56,5 D ₄ : 133,5 D ₅ : 11,2
	[LE-400] [Schweikert, 35]	D ₁ : 95 D ₂ : 0 D ₄ : 56 D ₅ : 81	D ₁ : 509 n.b D ₄ : 2514 D ₅ : 2610

Tab. 5.3: Literatur-Bindungsdaten methoxylierter und hydroxylierter Dibenz-azecine. [27]

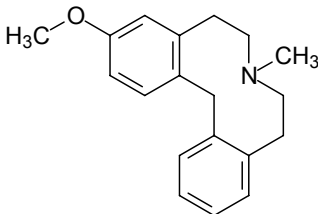
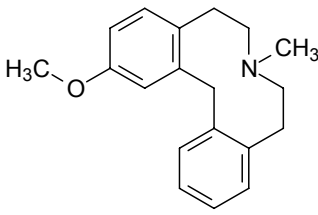
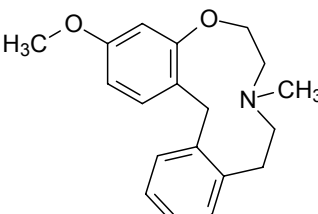
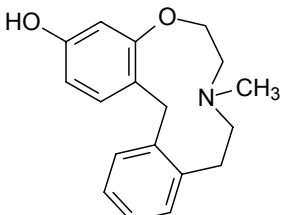
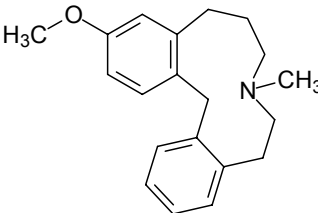
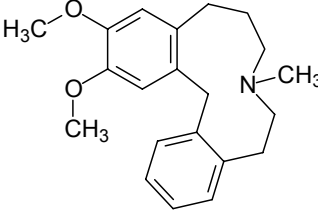
Strukturformel	[Chiffre intern] [Hersteller, Literatur]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 μ M Lösung	K _i -Wert [nM] \pm MABW
	[LE-403] [Schweikert, 35]	D ₁ : 99	D ₁ : 341
		D ₂ : 51	n.b.
		D ₄ : 90	D ₄ : 165
		D ₅ : 89	D ₅ : 1078
	[LE-404] [Schweikert, 35]	D ₁ : 99	D ₁ : 0,49
		D ₂ : 98	D ₂ : 17,5
		D ₄ : 98	D ₄ : 11,3
		D ₅ : 97	D ₅ : 1,5

Fortsetzung **Tab. 5.3**

Decker [27] konnte also feststellen, daß sich eine Zweifachsubstitution am Phenylring in Position zwei und drei bindungsschwächend gegenüber dem unsubstituierten Dibenz-azecin auswirkte. Dies gilt sowohl für die Substitution durch Methoxy- als auch durch Hydroxy-Gruppierungen, die beide einen geringen induktiven, aber starken mesomeren Effekt auf das aromatische System ausüben. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, daß sich eine einzelne Hydroxy-Funktion in Position drei stark affinitätssteigernd auswirkte. Dies erschien besonders mit Blick auf das übereinstimmende Substitutionsmuster der Verbindung **LE-403** mit dem endogenen Liganden Dopamin überraschend. Eine Selektivität der untersuchten Substanzen zu einer der beiden Rezeptor-Subtypfamilien oder nur einem Rezeptor-Subtyp konnte von Decker nicht festgestellt werden.

Diese Erkenntnisse führten zur Synthese der in der folgenden Tabelle dargestellten mono-substituierten Dibenz-azecine.

Die erkannten Struktur-Wirkungsbeziehungen sollen im Folgenden auch auf ihre Gültigkeit bei den methoxylierten und hydroxylierten elfgliedrigen Homo-azecinen und Homo-oxa-azecinen untersucht werden (s. Tab. 5.4).

Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern] [Hersteller, Literatur]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 µM Lösung	K _i -Wert [nM] ± MABW oder ± STABW (*)
	12 [LE-PM-425] [Mohr, 56, 69]	D ₁ : 97 D ₂ : 99	D ₁ : 28,5 ± 9,7 D ₂ : 13 ± 9
	12 [LE-PM-429] [Mohr, 56, 69]	D ₁ : 91 D ₂ : 94	D ₁ : 82 ± 30 D ₂ : 62 ± 5
	33 [LE-WW-450] [Wittig]	D ₁ : 97 D ₂ : 95 D ₄ : 93 D ₅ : 100	D ₁ : 35,5 ± 11,7 D ₂ : 158 ± 38 D ₄ : 546 ± 110* D ₅ : 1,8 ± 0,2
	40 [LE-WW-451] [Wittig]	D ₁ : 100 D ₂ : 90 D ₄ : 90 D ₅ : 100	D ₁ : 3,2 ± 0,8* D ₂ : 274 ± 0,5 D ₄ : 375 ± 106 D ₅ : 0,57 ± 0,1
	13 [LE-CE-476] [Enzensperger, 70, 71]	D ₁ : 99 D ₂ : 91	D ₁ : 20,4 ± 9,3 D ₂ : 24,4 ± 0,3
	13 [LE-CE-475] [Enzensperger, 70, 71]	D ₁ : 76 D ₂ : 67	D ₁ : 649 ± 158 D ₂ : 1028 ± 461

Tab. 5.4: Bindungsdaten methoxylierter und hydroxylierter Dibenzo[d,g]azecine, Dibenzo[d,g]-2-azacycloundecene und Dibenzo[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene.

Ebenso wie die hydroxylierten Dibenz-azecine zeigen auch die methoxylierten Derivate eine höhere Affinität zum D₁- und zum D₂-Rezeptor, wenn sie nur einen Substituenten aufweisen. Die Zunahme der Affinität zum D₁-Rezeptor beim Wegfall des zweiten Substituenten in 2-Stellung (ca. Faktor zwanzig) ist allerdings nicht so dramatisch wie bei den hydroxylierten Derivaten (ca. Faktor siebenhundert). Das lediglich in Position zwei methoxy-substituierte Derivat **LE-PM-429** weist ebenso wie die in 3-Stellung methoxylierte Verbindung **LE-PM-425** eine deutlich höhere Affinität zu beiden Dopamin-Rezeptorsubtypen auf, als die zweifach methoxylierte Verbindung, allerdings ist diese Affinität etwa vierfach schwächer als beim 3-Methoxy-derivat. Anzumerken ist, daß eine Monomethoxy-Gruppierung in beiden Fällen eine Senkung der Affinität zum D₁-Rezeptor gegenüber der unsubstituierten Verbindung **LE-410** bedeutet.

Das untersuchte Monomethoxy-dibenz[*d,g*]-2-azacycloundecen zeigt im Vergleich zum dimethoxylierten Derivat ebenfalls eine zwanzig- bis dreißigfach erhöhte Affinität zum D₁- und zum D_{2L}-Rezeptor.

Bei den untersuchten Oxa-homo-azecinen **33** und **40** ist wie bei den Dibenz-azecinen eine Überlegenheit der 3-Monohydroxy-Substitution bezüglich der Affinität zum D₁-Rezeptor gegenüber einer Methoxy-Gruppierung in 3-Stellung zu beobachten, die mit einem Faktor zehn allerdings etwas schwächer ausfällt als bei den zehngliedrigen Homologen (ca. Faktor sechzig). Während das 3-Methoxy- und das 3-Hydroxy-dibenz[*d,g*]azecin (**LE-PM-425** und **LE-404**) einen fast identischen K_i-Wert am D₂-Rezeptor aufweisen, zeigt die hydroxylierte Verbindung **40** eine deutlich schwächere Affinität zu diesem Rezeptorsubtyp als die methoxylierte Verbindung **33**. Eine 3-Hydroxy-Substitution der Oxa-homo-azecine führt also zu einer Verstärkung der bereits bei Verbindung **33** beobachteten D₁/D₂-Selektivität, resultierend in einem Verhältnis von etwa 1:90. Dies ist die bis dato höchste, in Radioligandbindungsstudien (s. auch [27]) gemessene D₁/D₂-Selektivität in der Reihe der kondensierten Azecine und Homo-azecine.

Die schon bei der methoxylierten Verbindung **33** beobachtete hohe Affinität zum D₅-Rezeptor ist bei dem Hydroxy-Analogen **40** noch einmal um den Faktor drei erhöht. Es ist hier also ein subnanomolarer K_i-Wert (0,57 nM) am D₅-Rezeptor zu beobachten, der nur knapp über dem des Standardantagonisten **SCH 23390** liegt (K_i=0,3 nM [20]). Die Bindungsprävalenz zum D₅-Rezeptor gegenüber dem D₁-Rezeptor ist hier allerdings schwächer ausgeprägt (K_i am D₁-Rezeptor: 3,2 nM).

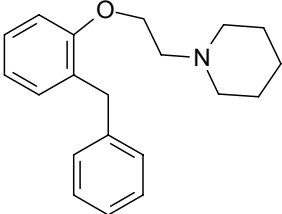
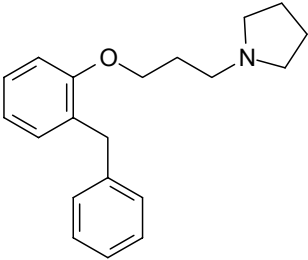
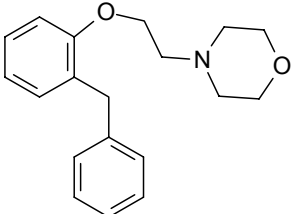
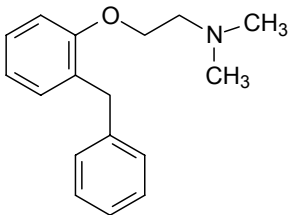
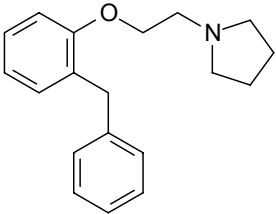
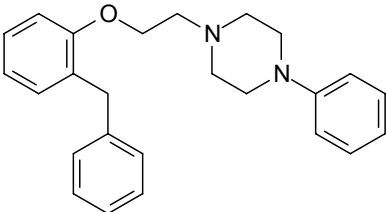
Bezüglich der Bindungseigenschaften der Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecene an den Subtypen der D₂-Rezeptorfamilie erscheint interessant, daß die 3-Hydroxy-Substitution gegenüber der 3-Methoxy-Substitution zu einer Absenkung der Affinität zum D_{2L}-Rezeptor, aber zu einer Erhöhung der Affinität zum D₄-Rezeptor führt. Dieser Effekt ist allerdings nur schwach ausgeprägt.

Es liegt nahe, die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der hydroxylierten Verbindungen gegenüber den methoxylierten Verbindungen auf eine mögliche Wechselwirkung mit dem Rezeptor über Wasserstoff-Brückenbindungen zu erklären, jedoch kann auch dies allein anhand von Radioligandbindungsstudien nicht bewiesen werden.

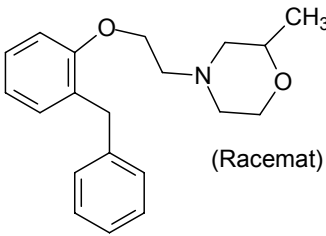
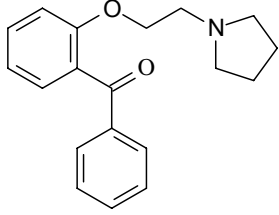
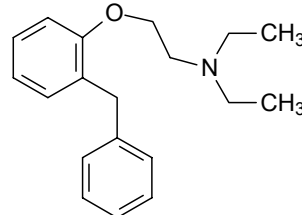
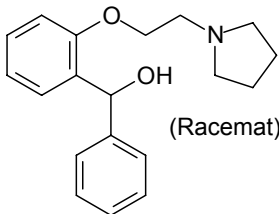
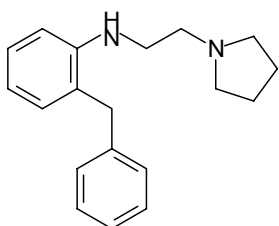
- *In 2- oder 3-Stellung mono-substituierte Dibenz-azecine und Dibenz-azacycloundecene zeigen höhere Affinitäten zu D₁- und D₂-Rezeptoren als ihre zweifach substituierten Analoga. Dieser Effekt ist stärker ausgeprägt bei einer Substitution in 3-Stellung als in 2-Stellung. Eine Hydroxy-Gruppierung in Position 3 erhöht in beiden Substanzklassen die Affinität zum D₁-Rezeptorsubtyp im Vergleich zu einer Methoxy-Gruppierung und verstärkt im Falle der Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecene die bereits bei Verbindung **33** beobachtete D₁/D₂-Selektivität. Verbindung **40** zeigt die in der Reihe der kondensierten Azecine und Homo-azecine höchste gemessene Affinität zum D₅-Rezeptorsubtyp.*

5.4 Auswirkung eines totalen Rigiditätsverlustes auf Affinität und Selektivität zu Dopamin-Rezeptorsubtypen anhand der offenkettigen Analoga der elfgliedrigen Ringsysteme

Anhand der im Folgenden dargestellten Bindungsdaten der in Kap. 2.2 beschriebenen offenkettigen Analoga der Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecene in abnehmender Reihenfolge der Affinität zum D₁-Rezeptorsubtyp sollen deren Bindungseigenschaften im Vergleich zu denen der intakten Ringsysteme diskutiert werden. Hinsichtlich der strukturellen Variabilität in der Reihe der synthetisierten offenkettigen Analoga sollen ferner Struktur-Wirkungs-Beziehungen erstellt werden.

Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 μ M Lösung	K _i -Wert [nM] \pm MABW
	54 [LE-WW-455]	D ₁ : 91 D ₂ : 73 D ₄ : 64 D ₅ : 99	D ₁ : 33,7 \pm 0,4 D ₂ : 1015 \pm 516 D ₄ : 4476 \pm 2496 D ₅ : 43 \pm 5
	59 [LE-WW-459]	D ₁ : 98 D ₂ : 61 D ₄ : 24 D ₅ : 96	D ₁ : 113 \pm 3 D ₂ : 1006 \pm 342 D ₄ : 1261 \pm 84 D ₅ : 113 \pm 26
	55 [LE-WW-456]	D ₁ : 87 D ₂ : 13 D ₄ : 24 D ₅ : 82	D ₁ : 201 \pm 98 D ₂ : 19305 \pm 555 D ₄ : 6484 \pm 462 D ₅ : 366 \pm 8
	51 [LE-WW-452]	D ₁ : 90 D ₂ : 58 D ₄ : 50 D ₅ : 91	D ₁ : 343 \pm 28,5 D ₂ : 2740 \pm 415 D ₄ : 2765 \pm 469 D ₅ : 414 \pm 18
	53 [LE-WW-454]	D ₁ : 90 D ₂ : 34 D ₄ : 47 D ₅ : 98	D ₁ : 379 \pm 157 D ₂ : 10455 \pm 245 D ₄ : 1428 \pm 198 D ₅ : 951 \pm 334
	57 [LE-WW-458]	D ₁ : 70 D ₂ : 41 D ₄ : 46 D ₅ : 90	D ₁ : 1480 \pm 197 D ₂ : 4188 \pm 302 n.b. D ₅ : 620 \pm 255

Tab. 5.5: Bindungsdaten offenkettiger Analoga der Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene in abnehmender Reihenfolge ihrer Affinität zum D₁-Rezeptorsubtyp.

Strukturformel	Chiffre Dissertation [Chiffre intern]	Abnahme der Rezeptor- gebundenen Radioaktivität (%) durch eine 10 μ M Lösung	K _i -Wert [nM] ± MABW
 (Racemat)	56 [LE-WW-457]	D ₁ : 73 D ₂ : 39 D ₄ : 37 D ₅ : 68	D ₁ : 1646 ± 429 D ₂ : 18160 ± 3020 n.b. n.b.
	60 [LE-WW-460]	D ₁ : 51 D ₂ : 24 D ₄ : 11 D ₅ : 65	D ₁ : 1651 ± 458 D ₂ : 5317 ± 1038 n.b. n.b.
	52 [LE-WW-453]	D ₁ : 73 D ₂ : 60 D ₄ : 32 D ₅ : 89	D ₁ : 1959 ± 140 D ₂ : 2024 ± 7 n.b. n.b.
 (Racemat)	61 [LE-WW-461]	D ₁ : 73 D ₂ : 32 D ₄ : 11 D ₅ : 59	D ₁ : 2621 ± 1121 D ₂ : 6280 ± 1621 n.b. n.b.
	64 [LE-WW-462]	D ₁ : 51 D ₂ : 52 D ₄ : 20 D ₅ : 68	n.b. n.b. n.b. n.b.

Fortsetzung **Tab. 5.5**

Die vorstehende Tabelle zeigt für alle dort dargestellten Substanzen niedrigere K_i-Werte an den untersuchten Dopamin-Rezeptorsubtypen als für die analogen elfgliedrigen Ringsysteme. Die offenkettigen Verbindungen mit einer frei im Raum drehbaren Alkylaminoalkylkette zeigen also eine geringere Affinität zu den Rezeptorsubtypen als die eine noch gewisse Rigidität aufweisenden mittelgroßen

Ringsysteme. Aufgrund der fehlenden Substitution am Benzenring und der unterschiedlichen Substitution des Aminstickstoffs ist ein direkter Vergleich der Bindungseigenschaften mit den untersuchten Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecenen (s. Tab. 4.3) allerdings nicht möglich.

Aus dem Vergleich der Bindungsdaten der offenkettigen Verbindungen untereinander geht hervor, daß fast alle Testsubstanzen dieser Reihe in ihrer Affinität eine mehr oder minder stark ausgeprägte Prävalenz zu den Rezeptoren der D₁-Subtypfamilie zeigen. Lediglich die Verbindungen **52** und **64** zeigen in etwa identische Affinitäten zum D₁- und D₂-Rezeptor. Die höchste D₁-/D₂-Selektivität mit einem Verhältnis der K_i-Werte von etwa 1:100 weist die einen Morpholinring tragende Verbindung **55** auf. Im Vergleich zu den Bindungsdaten des Piperidin-Analogons **54**, das die höchste Affinität zum D₁-Rezeptor zeigt (K_i = 33,7 nM), fällt auf, daß die Einführung eines Sauerstoffatoms in das aliphatische Ringsystem zu einem Verlust an Affinität zum D₂-Rezeptor führt. Dieser Effekt als Folge der Einführung eines Sauerstoffatoms in ein aliphatisches Ringsystem konnte bereits beim Oxa-homo-azecin **33** (**LE-WW-450**) im Vergleich zum Homo-azecin **LE-CE-476** (s. Kap. 5.2) beobachtet werden. Interessanterweise wird die D₁-Rezeptor-Affinität, und damit verbunden die D₁-/D₂-Selektivität, von Verbindung **55** deutlich abgeschwächt durch Einführung einer Methylgruppe in direkter Nachbarschaft der Etherfunktion. Der K_i-Wert am D₂-Rezeptor bleibt dabei unverändert.

Der Vergleich der Verbindungen **53** und **59**, die beide einen Pyrrolidinring als Alkylamino-Einheit tragen, zeigt, daß ein größerer Abstand zwischen der Ether- und der Aminofunktion sich affinitätssteigernd bezüglich aller untersuchten Dopamin-Rezeptorsubtypen auswirkt. Besonders am D₂- und D₅-Rezeptor zeigt Verbindung **59** mit drei Methylenheiten als "spacer" deutlich niedrigere K_i-Werte als Verbindung **53**, die eine Phenoxyethyl-Partialstruktur aufweist.

Aus den K_i-Werten von Verbindung **52** geht hervor, daß eine Diethylaminstruktur im Vergleich zum zyklischen Pyrrolidino-derivat **53** zu einer Erhöhung der Affinität zum D₂-Rezeptor und einer Abnahme der Affinität zum D₁-Rezeptor führt. Die eine Dimethyl-Gruppierung tragende Verbindung **51** zeigt ähnliche Bindungseigenschaften wie das Pyrrolidino-derivat **53** an den untersuchten Rezeptorsubtypen, mit Ausnahme des D₂-Subtyps, an dem auch hier eine höhere Bindungsaffinität beim nicht-zyklischen Produkt zu verzeichnen ist.

Eine Phenylpiperazin-substitution am Phenoxyethylamin-Stickstoff (Verbindung **57**) führt zu nur moderaten Affinitätswerten im mikromolaren Bereich der ermittelten K_i -Werte, ebenso wie eine Alkohol- oder Keto-funktion am Benzyl-C-Atom (Verbindungen **60** und **61**).

Das Anilino-derivat **64** bindet nur sehr schwach an den D_1 - und D_2 -Rezeptor, wie aus dem direkten Vergleich mit der sonst strukturell gleichen Verbindung **53** erkannt werden kann.

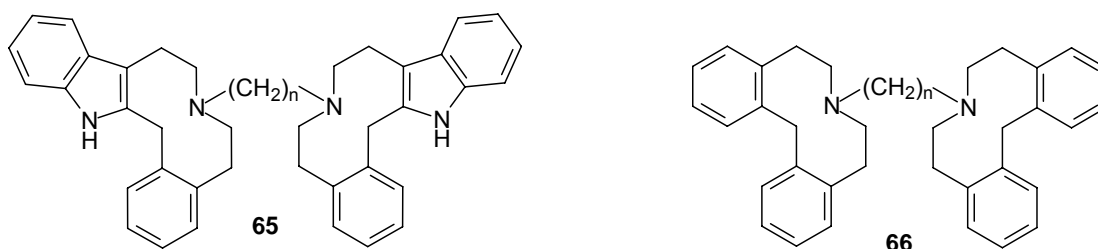
- *Die offenkettigen Analoga der Oxa-homo-azecine sind weniger affin zu Dopamin-Rezeptoren als die zyklischen Verbindungen, einige von ihnen zeigen aber eine signifikante Selektivität zu den Rezeptoren der D_1 -Subtypfamilie, die bei der einen Morphinring tragenden Verbindung **55** am stärksten ausgeprägt ist. Das Piperidin-Analogon **54** zeigt die höchste Affinität zum D_1 -Rezeptor. Ein größerer Abstand zwischen der Ether- und der Aminfunktion, bewirkt durch drei statt zwei Methylengruppen, wirkt sich affinitätssteigernd zu allen untersuchten Rezeptorsubtypen aus. Eine Alkohol- oder Keton-funktion am Benzyl-C-Atom wirkt bindungsschwächend am D_1 -Rezeptor. Der Austausch der phenolischen Etherfunktion gegen eine Anilinstruktur führt zu einer starken Abnahme der Affinität zum D_1 - und D_2 -Rezeptor.*

5.5 Bindungseigenschaften der dimeren Dibenz-azecine in Abhängigkeit von ihrer Spacerlänge

Abadi et al [29] konnten feststellen, daß Dimere des Benzindolo-azecins **LE 300 (65)** mit einer variablen Anzahl von Methylengruppen als Spacer signifikante Affinitäten zu Dopamin-Rezeptorsubtypen zeigen (K_i an D_1 und D_2 : 40 – 1000 nM), obwohl im Falle der Monomere längere Alkylgruppen am Stickstoffatom diese Affinität senken. Dies kann mit einer "doppelten" Wechselwirkung, also einer Bindung dieser Liganden an zwei Rezeptoren erklärt werden [55], da der Hill-Koeffizient in den Bindungsexperimenten den Wert eins aufwies. Ein Affinitätsmaximum sowohl am D_1 - als auch am D_2 -Rezeptor konnte bei einer Hexyleneinheit als spacer ermittelt werden.

In dieser Arbeit wurden Dimere des am Benzenring unsubstituierten Dibenz-azecins **LE-410 (66)** mit unterschiedlich langen Alkylenspacern auf ihre Affinität zum D_1 - und

D₂-Rezeptor untersucht, da diese Verbindung ähnlich hochaffine Bindungseigenschaften zu Dopamin-Rezeptorsubtypen zeigt wie **LE 300** (s. Kap. 4.2 und 5.3).



Aus den ermittelten K_i -Werten geht ein unterschiedliches Affinitätsprofil der Dibenz-azecin-dimere (**66**) im Vergleich zu dem der Benzindolo-azecin-dimere (**65**) hervor (s. Abb. 5.1). So weisen erstere eine sehr viel schwächere Affinität zum D₁-Rezeptor auf (K_i (D₁): 4 - 50 μ M), die Affinität zum D₂-Rezeptor (K_i (D₂): 0,8 - 6,5 μ M) ist im Vergleich zu den Benzindolo-annelierten Azecinen nur wenig abgeschwächt. Interessanterweise weist in der Reihe der Dibenzen-annelierten Dimere das Derivat mit fünf Methyleinheiten als Spacer zwischen den Azecin-monomeren die stärkste Affinität zum D₁-Rezeptorsubtyp auf (K_i (D₁): 4,1 μ M).

Korrelation zwischen der Anzahl der Methyleinheiten im Spacer und der Affinität zu D₁- und D₂-Rezeptoren

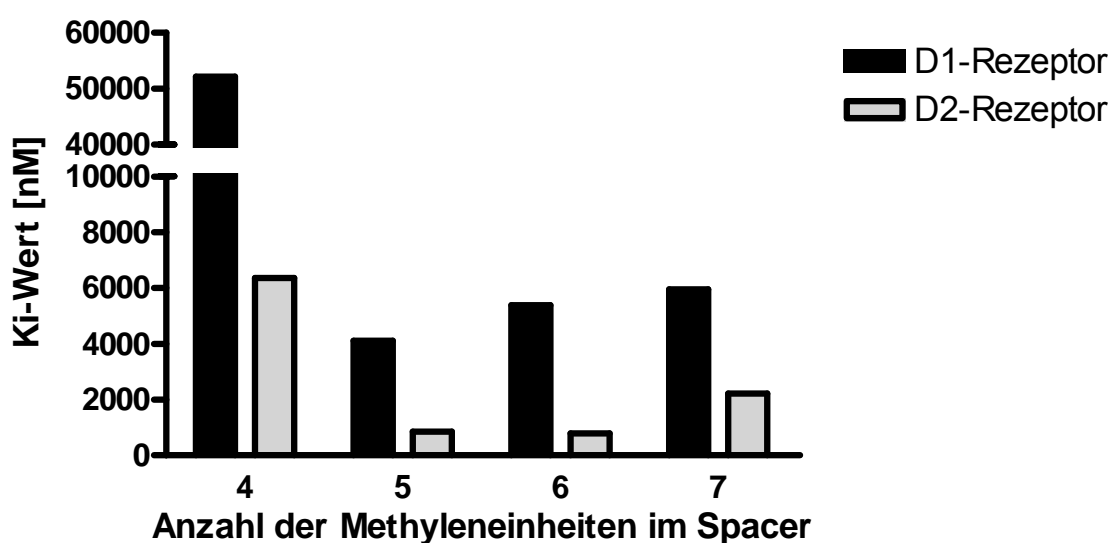


Abb. 5.1: Korrelation zwischen der Anzahl der Methyleinheiten im Spacer der untersuchten Dibenz-azecin-dimere (**66**) und der ermittelten K_i -Werte am D₁- und D₂-Rezeptor.

Die stärkste Affinität zum D₂-Rezeptor besitzt in Analogie zu den Bis-benzindolozecinen das durch sechs Methylengruppen verbundene Bis-dibenz-azecin.

Während *Abadi* [29] bei der Dimerisierung von **LE 300** lediglich einen Verlust der D₁-Selektivität beobachtete, ist bei allen untersuchten **LE 410** - Dimeren eine D₂-Selektivität zu beobachten, die mit einem Verhältnis der K_i-Werte von etwa 1:10 (D₂ : D₁) ihr Maximum bei der Verbindung mit vier Methylenheiten im Spacer erreicht (s. Abb. 5.1). In Übereinstimmung mit den Bindungsdaten der Bis-benzindolozecine [29] zeigen auch die dimeren Dibenz-azecine eine Abschwächung der Bindungsaffinität mit zunehmender Kettenlänge des Alkylenspacers, in diesem Falle allerdings schon ab einer Kettenlänge von sechs Methylenheiten.

Da die Monomere der untersuchten dimeren Liganden beider Substanzklassen, wie bereits oben erwähnt, sehr ähnliche Bindungseigenschaften aufweisen, ist der Grund für das unterschiedliche Affinitätsprofil möglicherweise in der Konformation der Dimere in Lösung, in der sie am jeweiligen Rezeptor vorliegen, zu suchen (Zur Diskussion der Konformation der kondensierten Azecin-dimere s. auch Kap. 2.3).

- *Dibenz-azecin-dimere zeigen eine schwächere Affinität zu D₁- und D₂-Rezeptoren als dimere Benzindolozecine. Das Maximum der Affinität zum D₁-Rezeptorsubtyp liegt bei einer Kettenlänge des Alkylenspacers von fünf Methylengruppen, das der Affinität zum D₂-Rezeptorsubtyp bei sechs Methylengruppen. Bis-dibenz-azecine weisen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Bindungs-Selektivität zum D₂- gegenüber dem D₁-Rezeptor auf.*

6 Funktionelle Untersuchungen

Die Zielverbindung **40** (s. Abb. 6.1) wurde in einem von *M. Kassack und B. Hoefgen* [74] etablierten Calcium assay auf ihre funktionellen Eigenschaften am hD₁-Rezeptor untersucht.

Dabei wurde unter Verwendung eines Fluoreszenz-Microplate-Readers der von einem Standardagonisten (SKF 38393) vermittelte Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in Anwesenheit steigender Konzentrationen der Testsubstanz in Lösung vermessen (bzgl. näherer Details des assays s. [74]).

Für diese Untersuchung wurde dieselbe HEK-hD₁-Zelllinie wie auch für die Radioligandbindungsexperimente verwandt. Es wurden zwei voneinander unabhängige Experimente, jeweils in einer Sechsfachbestimmung durchgeführt.

Die Auswertung der Meßdaten (s. [26]) ergab eine eindeutig zu beobachtende Abschwächung des durch den Agonisten vermittelten Anstiegs der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mit steigender Konzentration der Testsubstanz (s. Abb. 6.1). Der anhand der Inhibitionskurve ermittelte K_i-Wert von **40** liegt mit 12,3 nM etwas über dem aus den Radioligandbindungsexperimenten errechneten K_i-Wert (3,2 nM). Das 3-Hydroxy-dibenz-1-oxa-4-azacycloundecen (**40**) zeigt also inhibitorische Eigenschaften am D₁-Rezeptor. Eine genaue Zuordnung zu einem antagonistischen oder invers agonistischen Verhalten am Rezeptor ist anhand des in dieser Weise durchgeführten Versuches allerdings nicht möglich.

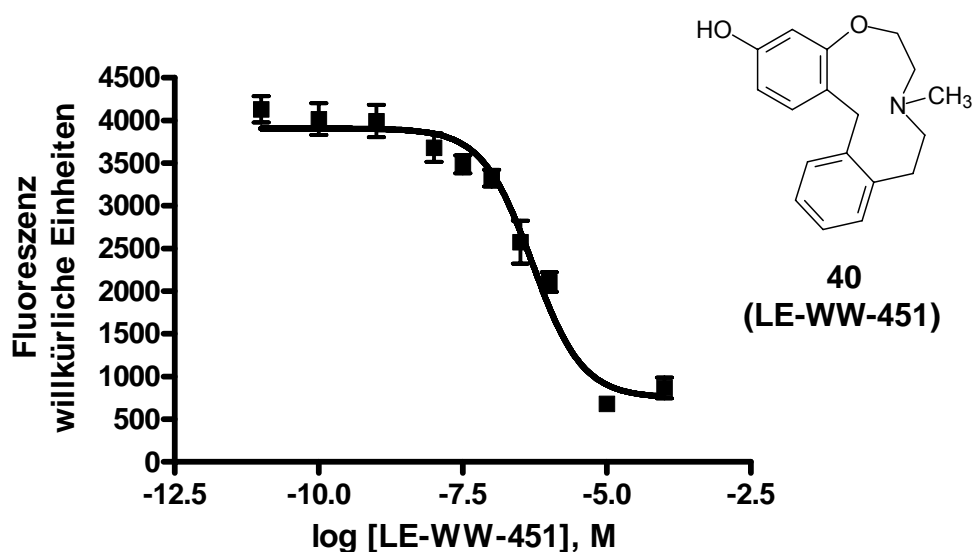


Abb. 6.1: Inhibitionskurve aus Ca²⁺-assay an der HEK-hD₁-Zelllinie durch Zugabe steigender Konzentrationen von **40** nach Präinkubation mit SKF 38393.

7 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf bekannten, im Arbeitskreis ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen, neuartige Dopamin-Rezeptorliganden zu synthetisieren und diese durch pharmakologisches Screening auf ihre Bindungseigenschaften an den entsprechenden Rezeptorsubtypen zu untersuchen.

Auf diese Weise sollten Strukturen identifiziert werden, die durch ihr charakteristisches Affinitäts- bzw. Selektivitätsprofil als pharmakologische "Werkzeuge" zur Erforschung dopaminerger Neurotransmission oder als potentielle Neuroleptika einsetzbar sind, die aufgrund der erhofften D₁-Rezeptor-Selektivität ein günstiges Nebenwirkungsprofil hinsichtlich der durch D₂-Rezeptor-Aktivierung vermittelten extrapyramidal-motorischen Störungen aufweisen könnten.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich somit thematisch in zwei Teile: Im ersten Teil wird die Synthese neuer heterozyklischer Ringysteme, die einen zentralen elfgliedrigen Oxa-azacycloundecenring aufweisen, sowie die Synthese offenkettiger Analoga dieser Ringsysteme beschrieben. Zu diesem Themenbereich gehört auch die Synthese dimerer Dibenz-azecin-liganden. Das Screening der dargestellten Substanzen mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien, verbunden mit der Diskussion der Ergebnisse dieser Experimente im Sinne von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, werden im zweiten Teil der Arbeit behandelt, ebenso wie die Ergebnisse funktioneller Untersuchungen an einer der Zielverbindungen.

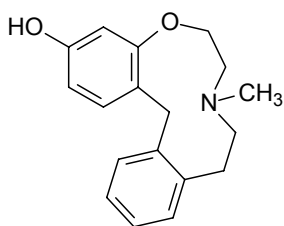
Die Darstellung der Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecene erfolgte durch Quarternisierung von Isochino-benzoxazepinen, die ebenfalls neuartige heterozyklische Ringsysteme darstellen, und nachfolgende Ringerweiterung unter den Bedingungen einer *Birch*-Reduktion. Die tetrazyklischen Edukte wurden, ausgehend von Phenoxyethylaminen, nach einem von *Meise* [36] entwickelten Syntheseweg zur Darstellung homologer Isochino[1,2-*a*][2]benzazepine synthetisiert. Eine erwünschte Monohydroxy-Substitution am Benzenring konnte durch die Einführung einer unter *Birch*-Bedingungen abspaltbaren Benzyloxy-Schutzgruppe verwirklicht werden. Verschiedene Ring-offene Derivate der o.a. heterozyklischen Verbindungen wurden über Veretherungen von 2-Benzylphenolen nach *Mitsunobu* synthetisiert. Die Strukturen vom (2-Benzylphenoxy)-alkylamintyp variierten dabei hinsichtlich der endständigen Amingruppierung, der Länge der Alkylkette und der Substitution am Benzyl-C-Atom. Auch ein analoges Anilinoderivat wurde synthetisiert. Dimere der

Dibenz[*d,g*]azecine mit unterschiedlich langen Alkylenspacern wurden auf dieselbe Weise wie die von *Abadi* [29] beschriebenen Bis-benzindolo-azecine durch Ringerweiterung dimerer Benzindolo-chinoliziniumsalze dargestellt. Für die Darstellung von 5-Phenyl-1,4-Benzoxazepinen konnte ein neuer Syntheseweg über nur drei Reaktionsschritte entwickelt werden.

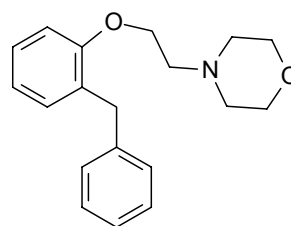
Beide im synthetischen Teil dieser Arbeit beschriebenen Zielverbindungen mit mittelgroßen Ringsystemen (**33** und **40**), sowie die offenkettigen Analoga und die dimeren Azecine wurden in Radioligandbindungsexperimenten auf ihre Affinität zu den Dopamin-Rezeptorsubtypen hD₁, hD_{2L}, hD_{4,4}, und hD₅ gescreent. Dies geschah an klonalen HEK- oder CHO-Zelllinien, die stabil den jeweiligen Rezeptor exprimierten. Durch die methodische Anpassung der bereits vorher in unserem Arbeitskreis durchgeführten Radioligandbindungsstudien an ein 96er Mikrotiterplattenformat und einen halbautomatischen Filtrivorgang wurde es möglich, mehr Proben in kürzerer Zeit zu vermessen, und so schneller Rückschlüsse auf die synthetische Arbeit zu erhalten. In das Screening wurden auch Testsubstanzen aus der Reihe der Dibenz[*d,g*]azecine und Dibenz[*d,g*]-2-azacycloundecene mit einbezogen, die von anderen Mitgliedern des Arbeitskreises zur Verfügung gestellt wurden. So konnten aus der Gesamtheit der Ergebnisse Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden. Diese lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- *Eine Vergrößerung des zentralen zehngliedrigen Ringes der Dibenz[*d,g*]azecine um eine Methylengruppe bewirkt keine Veränderung der Bindungseigenschaften an den untersuchten Dopamin-Rezeptorsubtypen.*
- *Ein isosterischer Austausch der Methylengruppe in Position fünf der Dibenz[*d,g*]-2-azacycloundecene gegen ein Sauerstoffatom führt zu einer leicht erhöhten Selektivität zum D₁-Rezeptor gegenüber dem D₂-Rezeptor. Eine Hydroxysubstitution in Position drei verstärkt diesen Effekt.*
- *Das Dibenz-oxa-azacycloundecen **40** zeigt von den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen die höchste Affinität zum D₁-Rezeptor und gleichzeitig die höchste Affinität zum D₅-Rezeptor aller bisher untersuchten kondensierten Azecine und Homo-azecine (s. Abb. 5.1).*

- *Monomethoxylierte Dibenz-azecine und Homo-dibenz-azecine zeigen eine stärkere Affinität zu den untersuchten Dopamin-Rezeptorsubtypen als die dimethoxylierten Derivate. Eine Substitution in 3-Stellung ist dabei günstiger als in 2-Stellung.*
- *Offenkettige Analoga der Dibenz-oxa-azacycloundecene vom (2-Benzylphenoxy)-alkylamintyp sind schwächer affin zum D₁- und D₂-Rezeptor als ihre zyklischen Analoga.*
- *Die offenkettige Verbindung **55** zeigt von den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen die stärkste D₁/D₂-Selektivität (s. Abb. 5.1).*
- *Der Ersatz der phenolischen Etherfunktion der offenkettigen Analoga durch eine Anilinostruktur führt zu einem Verlust der Affinität zu den untersuchten Dopamin-Rezeptorsubtypen.*
- *Dibenz-azecin-Dimere weisen ein anderes Affinitätsprofil an D₁- und D₂-Rezeptoren auf als analoge Benzindolo-azecin-dimere und zeigen eine Selektivität zum D₂-Rezeptorsubtyp.*

**40 (LE-WW-451)**

D₁: 3,2 ± 0,8 D₂: 274 ± 0,5
 D₄: 375 ± 106 D₅: 0,57 ± 0,1

**55 (LE-WW-456)**

D₁: 201 ± 98 D₂: 19305 ± 555
 D₄: 6484 ± 462 D₅: 366 ± 8

Abb. 5.1: Struktur und Bindungsdaten (K_i -Werte) von **40** und **55**.

In einem funktionellen Calcium-assay konnte schließlich gezeigt werden, daß das Oxa-aza-homo-azecin **40** inhibitorische Eigenschaften am hD₁-Rezeptorsubtyp besitzt.

8 Abstract

The purpose of this thesis was, based on structure activity relationships (SAR) of condensed azecines, to determine the influence of a ring extension to eleven-membered cycloundecenes and the insertion of an oxygen atom into the central ringsystem on the binding properties of these molecules to dopamine receptors, in order to identify structures with a proposed affinity and selectivity to the D₁-receptor subtype family serving as potential new antidopaminergic therapeutics with fewer side effects or as pharmacological tools.

Novel dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecenes could be obtained by ring cleavage of the central C-N bond of quarternary isochino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepinium salts under the conditions of a *Birch*-reduction. The tetracyclic precursors were synthesized in a multistep procedure applying a *Bischler-Napieralsky*-reaction as the key cyclisation step and also represent new heterocyclic ringsystems. Open chained analogs were obtained by etherification of (2-benzyl)-phenols following the *Mitsunobu*-method, leading to (2-benzyl)-phenoxyalkylamines with variations in the amino-function as well as in the alkyl chain and in the substitution of the benzyl-C-atom. Dimeric dibenz[*d,g*]-azecines were synthesized in order to compare their capability as bivalent ligands with that of known benzindolo-azecine-dimers.

Radioligand binding studies at cloned human dopamine receptor subtypes (hD₁, hD_{2L}, hD_{4.4} and hD₅) revealed nanomolar affinities of the mid-sized heterocycles to both, the D₁- and D₅-receptor, and a subnanomolar K_i value at the D₅-receptor in case of the monohydroxylated compound. The selectivity of the oxa-homo-azecines to the D₁-receptor subtype family was found to be slightly enhanced compared to the desoxy-homo-azecines and could be rised by introduction of a monohydroxy substitution in 3-position. The ring-opened compounds proved to be less active at the dopamine receptors as their cyclic analogs, but showed significant D₁/D₂-selectivities in many cases. Binding experiments at the same receptors with dibenz-azecine derivatives displayed a higher affinity of monomethoxy- than dimethoxy-compounds and a different binding profile of their dimeric ligands compared to the bis-benzindolo-azecines.

The monohydroxy-oxa-homo-azecine showed an inhibitory activity at the hD₁-receptor in a functional Ca²⁺-assay.

9 Experimenteller, synthetischer Teil

9.1 Allgemeine Angaben

Schmelzpunkte wurden mit einem "Melting Point apparatus" der Firma Gallenkamp (UK) bestimmt und nicht korrigiert.

Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgel-Fertigfolien (Typ 60 F₂₅₄) der Firma Merck (Darmstadt) durchgeführt.

Zur **Säulenchromatographie** wurde Kieselgel vom Typ 60 der Firma Merck (Darmstadt) verwandt.

Elementaranalysen wurden im Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn mit einem "Vario EL" (Hereus, Hanau) vermessen.

Die **Molekularmassen** wurden nach der Atomgewichtstabelle von 1962 – bezogen auf ¹²C – berechnet.

Infrarotspektren wurden mit einem "Magna-IR"-Gerät vom Typ 550 der Firma Nicolet (WI, USA) vermessen.

¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden auf Geräten vom Typ DRX-500 (500 MHz) und Avance 250 (250 MHz) der Firma Bruker biospin (Karlsruhe) aufgenommen.

Gaschromatogramme und Massenspektren wurden im GC/MS-Verfahren mit Hilfe eines GCD-Plus – Apparates mit Elektronen-Ionisations-Detektor der Firma Hewlett Packard (USA) ermittelt. Dabei wurde zur Gaschromatographie eine HP-5MS Säule der Firma J&W Scientific (CA, USA) eingesetzt.

9.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: *Darstellung von 2-Benzylphenolethern nach Mitsunobu*

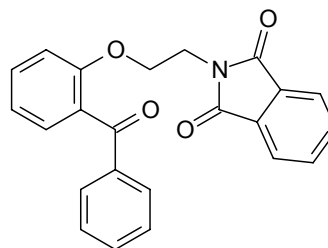
Zu einer Mischung von 40 mmol 2-Benzylphenol bzw. 2-Hydroxybenzophenon und 40 mmol des entsprechenden Alkohols, gelöst in 100 ml wasserfreiem THF, gibt man unter Schutzgas 45 mmol Triphenylphosphin. Das Gemisch wird sofort auf 0°C abgekühlt und 45 mmol Diisopropylazodicarboxylat (DIAD), gelöst in 15 ml wasserfreiem THF, werden über 2 h zugetropft. Man läßt die Lösung noch 48 Stunden bei RTiterrühren. Nach Entfernen des LM im Vakuum nimmt man den Rückstand in 50 ml Petrolether (40/60) auf und erhitzt für kurze Zeit zum Sieden. Nach wenigen Minuten beginnt ein weißer Feststoff auszufallen, der abfiltriert wird. Das Filtrat wird im Vakuum vom Petrolether befreit und das verbleibende Öl wird, wie in der Monographie beschrieben, gereinigt.

AAV 2: Darstellung von 2-Benzylphenoxyalkylaminen aus Bromo-alkylethern

15 mmol 2-Benzylphenyl-2-bromoethylether bzw. 2-Benzylphenyl-3-bromopropylether, 150 mmol des entsprechenden sekundären Amins und 30 mmol Kaliumcarbonat werden in 200 ml Toluol über 16h zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen filtriert man das Kaliumcarbonat ab und entfernt das LM im Vakuum. Der Rückstand wird, wie in der Monographie beschrieben, gereinigt.

9.3 Monographien

N-2-[2-(Benzoylphenoxy)-ethyl]-phtalimid



Zu 9,55 g (50 mmol) N-(2-Hydroxyethyl)-phthalimid und 9,9g (50 mmol) 2-Hydroxybenzophenon in 150 ml wasserfreiem THF gibt man unter Schutzgas 14,7 g (56 mmol) Triphenylphosphin. Die Lösung wird im Eisbad sofort auf 0°C abgekühlt und es werden 9,8g (56 mmol) Diisopropyldiazocarboxylat (DIAD) in 10 ml THF über 4 h zugetropft. Die Lösung wird noch weitere 48h bei RT unter Schutzgas gerührt. Das LM wird abgezogen und der Rückstand wird in 30 ml Methanol aufgenommen. Unter Rühren fällt ein weiß-gelber Feststoff aus, der aus Methanol umkristallisiert wird.

Ausbeute: 13,73 g (74 %) weiße Kristalle; R_f -Wert: 0,80 (Diethylether); Smp: 144 – 146 °C; IR: (KBr, cm^{-1}): 1770, 1707, 1651; MG: $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ (371 g/mol)

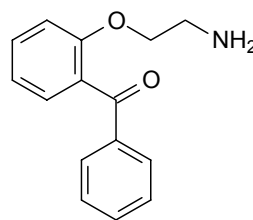
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	74,0	4,56	3,91
Berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{NO}_4$	74,4	4,58	3,77

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.82	t ($J = 6$ Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
4.20	t ($J = 6$ Hz)	2 H	OCH ₂ -CH ₂ N
7.00	d ($J = 8$ Hz)	1 H	H-17
7.04 – 7.07	m	1 H	aromat.
7.22 – 7.30	m	3 H	aromat.
7.32 – 7.34	m	1 H	aromat.
7.42 – 7.46	m	1 H	aromat.
7.66 – 7.70	m	4 H	aromat.
7.71 – 7.75	m	2 H	aromat.

**[2-(2-Aminoethoxy)phenyl]
-(phenyl)methanon (19)**



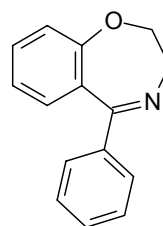
5,56 g (15 mmol) *N*-2-[2-(Benzoylphenoxy)ethyl]-phtalimid werden nach *Bremner* [42] in 25 ml frisch destilliertem 1,4-Dioxan und 25 ml konz. HCl gelöst und 48h unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer vom LM befreit und mit 20% NaOH unter Eiskühlung alkalisiert (pH 9–10). Es wird dreimal mit jeweils 20 ml Dichlormethan extrahiert, das LM über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Es bleibt ein gelbes Öl, das säulenchromatographisch gereinigt wird (SiO₂⁶⁰, CHCl₃/MeOH = 95:5).

Ausbeute: 2,6 g (72 %) (Lit.: 77%^[42]) blaßgelbes Öl; R_f-Wert: 0,15 (CHCl₃/MeOH 95:5) Lit.: 0,2^[42]; IR (KBr, cm⁻¹): 3380, 330, 1660; MG: C₁₅H₁₅NO₂ (241 g/mol)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.83	t (<i>J</i> = 6 Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
4.21	t (<i>J</i> = 6 Hz)	2 H	OCH ₂ -CH ₂ N
7.01	d (<i>J</i> = 8 Hz)	1 H	H-4
7.05 – 7.10	m	1 H	aromat.
7.23 – 7.37	m	4 H	aromat.
7.43 – 7.47	m	1 H	aromat.
7.67 – 7.78	m	6 H	aromat.

5-Phenyl-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin (20)



2,6 g (10,8 mmol) [2-(2-Aminoethoxy)phenyl](phenyl)methanon (**19**) werden in 40 ml Toluol gelöst und nach *Bremner* [42] 1 h unter Rückfluß erhitzt. Das LM wird über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt, es bleibt ein braun-gelbes Öl, das säulenchromatographisch gereinigt wird (SiO₂⁶⁰, CHCl₃/MeOH = 95:5) (gelbes Öl).

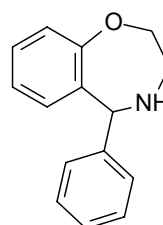
Ausbeute: 1,8 g (75 %) (Lit.: 79%^[42]) blaß gelblich-grünes Öl; R_f-Wert: 0,83 (CHCl₃/MeOH 95:5), Lit.: 0,8^[42]; IR (KBr, cm⁻¹): 1600; MG: C₁₅H₁₃NO (223 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	78,1	5,69	6,35
Berechnet für $C_{15}H_{13}NO \times \frac{1}{2} H_2O$	77,9	6,06	6,06

 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.79	t ($J = 5,5$ Hz)	2 H	OCH_2-CH_2N
4.64	t ($J = 5,5$ Hz)	2 H	$O-CH_2CH_2N$
7.03 – 7.10	m	3 H	aromat.
7.32 – 7.41	m	4 H	aromat.
7.58 – 7.63	m	2 H	aromat.

5-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-benzoxazepin (21)

Zu einer Lösung von 1,5 g (6,7 mmol) 5-Phenyl-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin (**20**) in 50 ml EtOH werden unter Eiskühlung langsam und in kleinen Portionen 0,4 g $NaBH_4$ über eine halbe Stunde zugegeben. Die Suspension wird noch 1 h bei RT weiter gerührt. Das LM wird am Rotationsverdampfer auf etwa 10 ml eingengt und es wird dreimal mit jeweils 20 ml Ether extrahiert. Das LM wird über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum entfernt. Es bleibt ein klares, farbloses Öl, das sich als DC-rein erweist.

Ausbeute: 1,3 g (84 %) farbloses Öl; R_f -Wert: 0,62 ($CHCl_3/MeOH$ 95:5); IR (KBr, cm^{-1}): 3404, 1572, 1490, 1215 ; Smp: 224°C (Hydrochlorid) MG: $C_{15}H_{15}NO$ (225 g/mol)

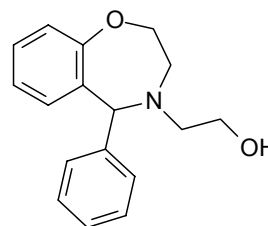
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	60,6	5,56	4,66
Berechnet für $C_{15}H_{15}NO$ (Hydrochlorid)	60,4	5,75	4,70

 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.23	mc	2 H	OCH_2-CH_2N
3.85 - 4.05	m	1 H	$O-CHHCH_2N$
4.10 – 4.25	m	1 H	$O-CHHCH_2N$
5.22	s	1 H	NH-CH
6.68	d ($J = 9$ Hz)	1 H	H-9
6.92	t ($J = 9$ Hz)	1 H	H-7
7.00 – 7.45	m	7 H	aromat.

2-(5-Phenyl-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-4(5*H*)-yl)ethanol (22)



1g (4,4 mmol) 5-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-benzoxazepin (**21**), 5,5g (44 mmol) Bromoethanol und 1 g Kaliumcarbonat werden in 20 ml wasserfreiem Toluol 16h bei 120°C refluxiert. Das K₂CO₃ wird abfiltriert und das LM im Vakuum entfernt. Es bleibt ein öliger Rückstand, der sich bereits als DC-rein erweist.

Ausbeute: 0,8 g (68%) beiges Öl; R_f-Wert: 0,62 (CHCl₃/MeOH 95:5);
MG: C₁₇H₁₉NO₂ (269 g/mol)

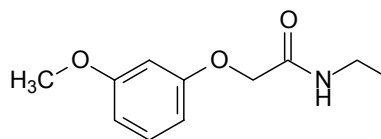
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.85 – 2.93	m	2 H	N-CH ₂ CH ₂ OH
3.63 – 3.76	m	4 H	NCH ₂ -CH ₂ OH und OCH ₂ -CH ₂ N (überlagert)
3.96 – 4.03	m	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
5.11	s	1 H	OH
6.97 – 7.10	m	3 H	aromat.
7.20 – 7.28	m	6 H	aromat.

GC/MS:

Hauptprodukt (82,8%) bei Rt: 15,16 min. (Split: 1:2, Injektor: 250°C, Detektor: 280°C, Anfangstemperatur: 90°C, Heizrate: 15°C/min. bis 270°C, dort noch für 14 min. verweilend) mit folgender MS-Detektion: m/z (rel. Int.): 269 (M⁺, 3), 238 (100), 192 (29), 165 (21), 132 (23), 91 (52), 56 (21)

**N-[2-(3-Methoxy- phenoxy)ethyl]
acetamid**



49,6g (0,4 mol) 3-Methoxyphenol und 34g (0,4 mol) 2-Methyloxazolin werden über 16h im 180°C heißen Ölbad erhitzt. Das entstandene Gemisch wird nach dem Abkühlen in 200 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit jeweils 30 ml 2N Salzsäure und 20%iger Natronlauge ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum vom LM befreit. Es verbleibt ein braunes Öl als Rückstand, das durch Vakuumdestillation gereinigt wird.

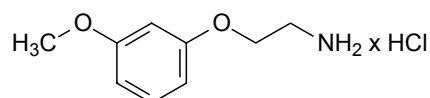
Ausbeute: 43,5g (52 %) hellgelbes Öl; R_f - Wert: 0,68 (CHCl₃/MeOH 90:10); Sdp: 179-184 °C (0,1 mbar); IR (KBr, cm⁻¹): 1657, 1597, 1148; MG: C₁₁H₁₅NO₃ (209 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	62,6	7,40	6,59
Berechnet für $C_{11}H_{15}NO_3 \times 1/8 H_2O$ (211,5)	62,4	7,21	6,62

 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.93	s	3 H	CO-CH ₃
3.56	q ($J = 6$ Hz)	2 H	OCH ₂ -CH ₂ NH
3.71	s	3 H	O-CH ₃
3.94	t ($J = 5$ Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₂ NH
6.04	br s	1 H	NH
6.37 – 6.40	m	3 H	aromat.
7.10	t 8 ($J = 8$ Hz)	1 H	aromat.

**2-(3-Methoxy-phenoxy)-ethylamin
hydrochlorid (25)**

20,8g (0,1 mol) N-[2-(3-methoxy-phenoxy)-ethyl]-acetamid werden mit 30g 85%iger Phosphorsäure und 10g Wasser versetzt. Das Gemisch wird für 16h bei 125°C im Ölbad zum Rückfluß erhitzt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wird unter Eiskühlung mit 20%iger Natronlauge neutralisiert und dreimal mit jeweils 30ml Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und gesättigter Kochsalzlsg. gewaschen und über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdampfen des LM verbleibt das Rohprodukt als braunes Öl, das in Ether gelöst und durch Zugabe von etherischer HCl-Lösung als Hydrochlorid gefällt wird.

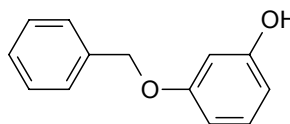
Ausbeute: 13,2g (65 %) weißes Pulver; R_f -Wert: 0,14 ($CHCl_3/MeOH$ 85:15); Smp: 135°C; IR (KBr, cm^{-1}): 3439, 2960, 1590; MG: $C_9H_{14}ClNO_2$ (203,5 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	53,1	6,96	6,72
Berechnet für $C_9H_{13}NO_2 \times HCl$	53,1	6,93	6,88

 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.01	t ($J = 5$ Hz)	2 H	OCH ₂ -CH ₂ NH ₂
3.71	s	3 H	O-CH ₃
3.91	t ($J = 5$ Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₂ NH ₂
6.40 – 6.45	m	3 H	aromat.
7.10	t ($J = 8$ Hz)	1 H	aromat.

3-(Benzyloxy)-phenol (41)

Eine Lösung von 150g (135 mol) Resorcin und 18,6g (135 mmol) Kaliumcarbonat in 500 ml trockenem Acetonitril wird 1h unter Stickstoffatmosphäre refluxiert. Nach Zutropfen von 23,1g (135 mmol) Benzylbromid in 250 ml trockenem Acetonitril über 1h lässt man die Lösung noch vier Tage unter Stickstoff und kräftigem Rühren refluxieren. Man lässt die Lösung auf RT abkühlen, filtriert, und entfernt das LM im Vakuum. Das verbleibende Öl wird in 200 ml Dichlormethan aufgenommen und jeweils zweimal mit 200 ml 2N Salzsäure und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das LM wird im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung ($\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) ergibt das Produkt als weissen Feststoff.

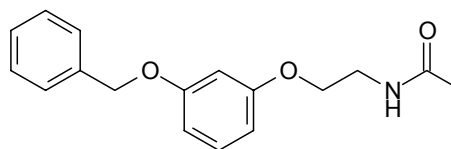
Ausbeute: 18,9g (70%) weiße Kristalle; R_f – Wert :0,96 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10); Smp: 51°C , Lit: $51\text{--}52^\circ\text{C}$ ^[49]; IR (KBr, cm^{-1}) ^[49]: 3424,3031,2936,2872, 2433,1594,1498, 1490,1454,1381, 1238,1216, 1146; MG: $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_2$ (200 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	75,8	6,02	-
Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_2 \times 1/3 \text{H}_2\text{O}$ (206,2)	75,7	6,16	-

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
5.01	s	2 H	Ph- CH_2O
6.12	s	1 H	aromat.
6.47 – 6.49	dd ($J = 7.1 \text{ Hz}$)	1 H	aromat.
6.60 – 6.62	dd ($J = 7.1 \text{ Hz}$)	1 H	aromat.
7.15	t ($J = 7 \text{ Hz}$)	1 H	aromat.
7.34 – 7.45	m	5 H	aromat.

N-{2-[3-(Benzyloxy)phenoxy]ethyl}acetamid (42)

20g (100 mmol) 3-(Benzyloxy)-phenol (**41**) und 8,5g (100 mmol) 2-Methyl-oxazolin werden über 16h im 180°C heißen Ölbad erhitzt. Das entstandene Gemisch wird nach dem Abkühlen in 100 ml Chloroform aufgenommen und jeweils dreimal mit jeweils 30 ml 2N Salzsäure und 20%iger Natronlauge ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum vom LM befreit. Es verbleibt ein braunes Öl als Rückstand, das über Nacht bei 4°C fest wird

Ausbeute: 19,1 g (67%) rot-braunes Pulver ; R_f - Wert: 0,60 (Diethylether);
 Smp: 42°C; IR (KBr, cm^{-1}): 1642, 1530, 1148 ; MG: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ (285 g/mol)

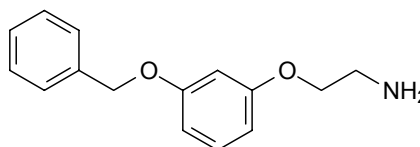
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	72,0	6,69	5,08
Berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$:	71,6	6,71	4,91

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.93	s	3 H	CO-CH_3
3.57	q ($J = 6$ Hz)	2 H	$\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{NH}$
3.94	t ($J = 6$ Hz)	2 H	$\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$
4.98	s	2 H	$\text{Ph-CH}_2\text{O}$
5.87	br s	1 H	CO-NH
6.40 – 6.57	m	3 H	H-2, H-4, H-6
7.07 – 7.20	m	1 H	H-5
7.25 – 7.39	m	5 H	H-15 bis H-20

**2-[3-(Benzyloxy)phenoxy]
ethylamin (43)**



18,6g (62,5 mmol) N-[2-(3-Benzyloxy-phenoxy)-ethyl]-acetamid (**42**) werden in 200 ml einer Lösung von 25%iger NaOH und Ethanol im Verhältnis 5:3 gelöst und 36h unter Rückfluß gerührt. Nach dem Erkalten der Lösung extrahiert man dreimal mit jeweils 30 ml Toluol. Das Lösungsmittel wird über MgSO_4 getrocknet, und im Vakuum entfernt. Es verbleibt ein gelbes Öl, das über Nacht bei 4°C fest wird .

Ausbeute: 15,2 g (96 %) gelbes Pulver; R_f - Wert: 0,13 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5);
 Schmelzpunkt: 196 – 197°C (Hydrochlorid); IR (KBr, cm^{-1}): 3416, 2907, 1597;
 MG: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ (243 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	61,3	6,34	5,00
Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_2 \times \text{HCL} \times \frac{3}{4} \text{H}_2\text{O}$ (292):	61,4	6,65	4,77

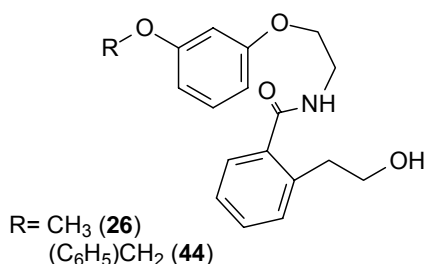
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.00	t ($J = 5$ Hz)	2 H	$\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{NH}_2$
3.89	t ($J = 5$ Hz)	2 H	$\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
4.98	s	2 H	$\text{Ph-CH}_2\text{O}$
6.42 – 6.56	m	3 H	H-2, H-4, H-6

7.05 – 7.15	m	1 H	H-5
7.24 – 7.39	m	5 H	H-14 bis H-18

2-(2-Hydroxyethyl)-N-[2-(3-methoxyphenoxy)ethyl]benzamid (26)

2-(2-Hydroxyethyl)-N-[2-(3-benzyloxyphenoxy)ethyl]benzamid (44)



60 mmol Phenoxyethylamin **25** bzw. **43** und 7,8g (52,5 mmol) Isochroman-1-on werden unter Zusatz von 1g Ammoniumchlorid 8h bei 120°C unter Rückfluß erhitzt. Das abgekühlte Gemisch wird in 150 ml Chloroform aufgenommen und zweimal mit jeweils 30 ml 2N Salzsäure ausgeschüttelt. Das LM wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird eine halbe Stunde unter Rühren auf dem 70°C heißen Wasserbad in 50 ml 20%iger Natronlauge erwärmt. Nach dem Erkalten extrahiert man dreimal mit jeweils 30 ml Chloroform. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum vom LM befreit. Nach Überschichten mit 20 ml Diethylether entsteht ein hellbrauner Feststoff, der aus EtOAc/Diethylether im Verhältnis 1:3 umkristallisiert wird.

2-(2-Hydroxyethyl)-N-[2-(3-methoxyphenoxy)ethyl]benzamid (26)

Ausbeute: 4,15g (22 %) weiße Kristalle ; R_f- Wert: 0,64 (CHCl₃/MeOH 95:5); Smp: 87°C ; IR (KBr, cm⁻¹): 3245, 1616, 1599; MG: C₁₈H₂₁NO₄ (315 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	68,5	6,78	4,44
Berechnet für C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	68,6	6,66	4,44

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.89	t (J = 6 Hz)	2 H	Ph-CH ₂
3.71	s	3 H	O-CH ₃
3.75 – 3.85	m	4 H	O-CH ₂ -CH ₂ -N
4.07	t (J = 6 Hz)	2 H	CH ₂ -OH
6.40 – 6.50	m	3 H	H-2, H-4, -H6
6.83	br s	1 H	NH
7.10 – 7.20	m	3 H	aromat.
7.30 – 7.35	m	2 H	aromat.

2-(2-Hydroxyethyl)-N-[2-(3-benzyloxyphenoxy)ethyl]benzamid (44)

Ausbeute: 7,5g (32%) beigefarbenes Pulver; R_f- Wert : 0,56 (CHCl₃/MeOH 95:5); Smp: 89°C; IR (KBr, cm⁻¹): 3184, 1627, 1575; MG: C₂₄H₂₅NO₄ (391 g/mol)

Elementaranalyse:

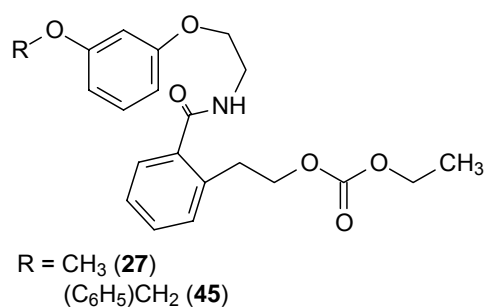
	C	H	N
Gefunden:	71,9	6,54	3,48
Berechnet für $C_{24}H_{25}NO_4 \times \frac{1}{2} H_2O$ (400,5):	71,9	6,50	3,49

 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.99	t ($J = 5.5$ Hz)	2 H	Ph-CH ₂ CH ₂ OH
3.81 – 3.97	m	4 H	O-CH ₂ CH ₂ -NH
4.17	t ($J = 5.5$ Hz)	2 H	PhCH ₂ -CH ₂ OH
5.08	s	2 H	Ph-CH ₂ O
6.53 – 6.68	m	3 H	H-2, H-4, H-6
7.18 – 7.50	m	10 H	aromat.

Ethyl-2-[2-([2-(3-methoxyphenoxy)ethyl]amino)-carbonyl]phenyl]ethyl-carbonat (27)

Ethyl-2-[2-([2-(3-benzyloxyphenoxy)ethyl]amino)-carbonyl]phenyl]ethyl-carbonat (45)



Zu einer Lösung von 13 mmol des 2-Hydroxyethyl-benzamids **26** bzw. **44** in 25 ml Chloroform und 50 ml Pyridin tropft man über eine halbe Stunde eine Lösung von 13 mmol Chlorameisensäureethylester in 10 ml Chloroform. Man läßt noch eine halbe Stunde bei RT rühren und entfernt das LM im Vakuum. Der Rückstand wird in 50 ml Chloroform aufgenommen und zweimal mit jeweils 20 ml 2N Salzsäure und 20%iger NaOH ausgeschüttelt. Nach Entfernen des LM im Vakuum verbleibt ein öliger Rückstand.

Ethyl-2-[2-([2-(3-methoxyphenoxy)ethyl]amino)-carbonyl]phenyl]ethyl-carbonat (27)

Ausbeute: 4,8g (95 %) gelb-braunes Öl; R_f -Wert: 0,73 ($CHCl_3$ /MeOH 95:5); IR (KBr, cm^{-1}): 1739, 1605, 1260, 1163; MG: $C_{21}H_{25}NO_6$ (387 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	63,2	6,50	3,83
Berechnet für $C_{21}H_{25}NO_6 \times \frac{1}{2} H_2O$ (396,43)	63,6	6,81	3,53

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.16	t (J = 7 Hz)	3 H	OCH ₂ -CH ₃
3.08	t (J = 7 Hz)	2 H	Ph-CH ₂
3.71	s	3 H	O-CH ₃
3.77	dt (J = 5 und 5 Hz)	2 H	OCH ₂ -CH ₂ N
4.03	q (J = 7 Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₃
4.08	t (J = 5 Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
4.30	t (J = 7 Hz)	2 H	CH ₂ OCO
6.35 – 6.45	m	4 H	aromat.
7.11	t (J = 7 Hz)	1 H	aromat.
7.20 – 7.35	m	3 H	aromat.

Ethyl-2-2-[(2-[3-(Benzyloxy)phenoxy]ethyl)amino]-carbonyl]phenyl]ethyl-carbonat (45)

Ausbeute: 5,2 g (86%) bernsteinfarbenes Öl; R_f-Wert : 0,87 (CHCl₃/MeOH 95:5);
 MG: C₂₇H₂₉NO₆ (463 g/mol)

Elementaranalyse:

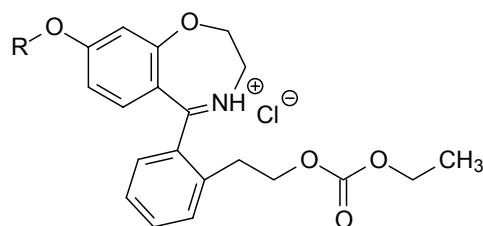
	C	H	N
Gefunden:	67,8	6,05	2,93
Berechnet für C ₂₇ H ₂₉ NO ₆ x H ₂ O (481,5)	67,4	6,49	2,91

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.15	t (J = 7 Hz)	3 H	CH ₂ CH ₃
3.07	t (J = 6,5 Hz)	2 H	Ph-CH ₂ CH ₂ O
3.76	dt (J = 5 und 5 Hz)	2 H	OCH ₂ -CH ₂ NH
4.02	q (J = 7 Hz)	2 H	CH ₂ CH ₃
4.07	t (J = 5 Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₂ NH
4.30	t (J = 6,5 Hz)	2 H	Ph-CH ₂ CH ₂ O
4.97	s	2 H	Ph-CH ₂ O
6.37 – 6.56	m	4 H	aromat.
7.08 – 7.15	m	1 H	aromat.
7.20 – 7.39	m	8 H	aromat.

Ethyl-2-[2-(8-methoxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)phenyl]-ethyl-carbonat hydrochlorid (28)

Ethyl-2-[2-(8-benzyloxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)phenyl]-ethyl-carbonat hydrochlorid (46)



R = CH₃ (28)
 (C₆H₅)CH₂ (46)

Eine Lösung aus 10 mmol des geschützten 2-Hydroxyethyl-benzamids **27** bzw. **45** in 80 ml Acetonitril und 8ml Phosphorylchlorid (jeweils frisch destilliert) wird sechs Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das LM wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in 20 ml 2N Salzsäure aufgenommen und zweimal mit jeweils 20 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die salzsaure wäßrige Phase wird nun fünfmal mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Es verbleibt ein schaumiger Rückstand, der in Ethanol/Diethylether im Verhältnis 1:1 umkristallisiert wird.

Ethyl-2-[2-(8-methoxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)phenyl]-ethyl-carbonat hydrochlorid (28)

Ausbeute: 1,9g (47%) weiße Kristalle; R_f -Wert: 0,53 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5); Smp: 156 - 158°C; IR (KBr, cm^{-1}): 1747, 1605, 1268, 1230, 1126; MG: $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClNO}_5$ (405 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	61,4	6,03	3,46
Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClNO}_5 \times 1/4 \text{H}_2\text{O}$ (410,4)	61,4	6,09	3,41

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.22	t ($J = 7$ Hz)	3 H	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$
2.97	t ($J = 7$ Hz)	2 H	Ph- CH_2
3.88	s	3 H	O- CH_3
4.06	q ($J = 7$ Hz)	2 H	CH_2CH_3
4.15 – 4.35	m	4 H	$\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{N}$ und CH_2OCO
4.72	mc	2 H	O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$
6.54	dd ($J = 2.5$ und 5.5 Hz)	1 H	aromat.
6.65	d ($J = 2.5$ Hz)	1 H	aromat.
7.03	d ($J = 9.5$ Hz)	1 H	aromat.
7.35 – 7.45	m	3 H	aromat.
7.53 – 7.57	m	1 H	aromat.

Ethyl-2-[2-(8-benzyloxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)phenyl]-ethyl-carbonat hydrochlorid (46)

Ausbeute: 2,0 g (42%) weiße Kristalle; R_f -Wert: 0,72 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5); Smp: 163°C; MG: $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{ClNO}_5$ (482 g/mol)

Elementaranalyse:

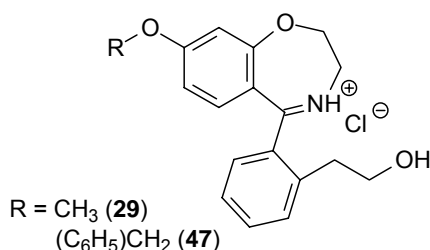
	C	H	N
Gefunden:	65,8	5,96	2,77
Berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{ClNO}_5 \times 1/2 \text{H}_2\text{O}$ (491)	66,0	5,91	2,85

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.26	t (<i>J</i> = 7 Hz)	3 H	CH ₂ -CH ₃
3.01	t (<i>J</i> = 7 Hz)	2 H	Ph-CH ₂ CH ₃
4.13	q (<i>J</i> = 7 Hz)	2 H	CH ₂ CH ₃
4.20–4.41	m	4 H	OCH ₂ -CH ₂ N und Ph-CH ₂ CH ₃
4.77	mc	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
5.18	s	2 H	PhCH ₂ O
6.66	dd (<i>J</i> = 2.5 und 5.5 Hz)	1 H	aromat.
6.785	d (<i>J</i> = 2.5 Hz)	1 H	aromat.
7.09	d (<i>J</i> = 9.5 Hz)	1 H	aromat.
7.37 – 7.51	m	9 H	aromat.
7.57 – 7.64	m	1 H	aromat.

2-[2-(8-Methoxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)]-ethanol hydrochlorid (29)

2-[2-(8-Benzoyloxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)]-ethanol hydrochlorid (47)



6 mmol des geschützten 5-Phenyl-benzoxazepin-hydrochlorids **28** bzw. **46** werden in 80 ml 20%iger ethanol. Kalilauge (70% Ethanol) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wird auf dem 40°C warmen Wasserbad etwa zur Hälfte eingengt und unter Eiskühlung mit 2N Salzsäure auf einen pH-Wert von 3-4 eingestellt. Es wird zweimal mit jeweils 20 ml EtOAc ausgeschüttelt und die salzsaure wäßrige Phase darauf fünfmal mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Es verbleibt ein schaumiger, weißer Feststoff, der keiner weiteren Aufreinigung bedarf.

2-[2-(8-Methoxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)]-ethanol hydrochlorid (29)

Ausbeute: 1,4g (69%) weißes Pulver; *R_f*-Wert: 0,66 (CHCl₃/MeOH 95:5); Smp: 188 - 189°C; IR (KBr, cm⁻¹): 3401, 1605, 1537, 1138; MG: C₁₈H₂₀ClNO₃ (334 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	60,5	6,28	4,00
Berechnet für C ₁₈ H ₂₀ ClNO ₃ x 1 1/4 H ₂ O (356,5)	60,6	6,31	3,93

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.65	t (J = 5 Hz)	2 H	Ph-CH ₂
3.85	mc	2 H	CH ₂ -OH
3.89	s	3 H	O-CH ₃
4.20 – 4.35	m	2 H	OCH ₂ -CH ₂ N
4.70 – 4.80	m	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
6.55	dd (J = 3 und 6 Hz)	1 H	H-7'
6.66	d (J = 3 Hz)	1 H	H-9'
7.02	d (J = 9 Hz)	1 H	H-6'
7.28	d (J = 7 Hz)	1 H	H-6
7.35 – 7.40	m	2 H	H-3 und H-4
7.57	dd (J = 7 und 7 Hz)	1 H	H-5

2-[2-(8-Benzyloxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-5-yl)]-ethanol hydrochlorid (47)Ausbeute: 1,7g (70%) weißes Pulver; R_f-Wert: 0,13 (CHCl₃/MeOH 95:5)Smp: 142 °C; MG: C₂₄H₂₄ClNO₃ (410 g/mol)

Elementaranalyse:

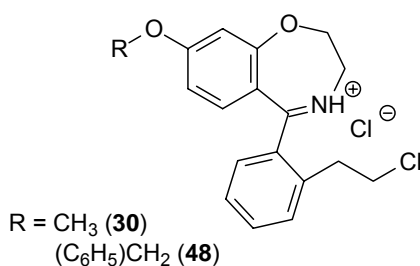
	C	H	N
Gefunden:	67,0	6,11	3,14
Berechnet für C ₂₄ H ₂₄ ClNO ₃ x H ₂ O (428)	67,3	6,07	3,27

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.70	t (J = 5 Hz)	2 H	Ph-CH ₂
3.90	mc	2 H	CH ₂ -OH
4.30 – 4.40	m	2 H	OCH ₂ -CH ₂ N
4.79	mc	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
5.18	s	2 H	PhCH ₂ O
6.66	dd (J = 2,5 Hz und 7 Hz)	1 H	H-7'
6.68	d (J = 2,5 Hz)	1 H	H-9'
6.79	d (J = 9 Hz)	1 H	aromat.
7.08	d (J = 9 Hz)	1 H	H-10'
7.30 – 7.35	m	1 H	aromat.
7.40 – 7.45	m	7 H	aromat.
7.58 – 7.67	m	1 H	aromat.

**5-[2-(2-Chloroethyl)phenyl]-8-methoxy-
2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin
hydrochlorid (30)**

**5-[2-(2-Chloroethyl)phenyl]-8-
benzyloxy-2,3-dihydro-1,4-benz-
oxazepin hydrochlorid (48)**



4 mmol entschütztes 5-Phenyl-benzoxazepin-hydrochlorid **29** bzw. **47** werden in 10 ml (109 mmol) Phosphorylchlorid im Ölbad auf 60°C erwärmt. Nach Abkühlen versetzt man mit 50 ml Petrolether (40/60), schüttelt kräftig und dekantiert den Petrolether ab. Es wird noch fünfmal mit jeweils 20 ml Petrolether digeriert und der verbleibende Rückstand in 15 ml 2N Salzsäure aufgenommen. Die salzsaure wäßrige Phase wird fünfmal mit jeweils 10 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Es verbleibt ein blassgelber Feststoff, der aus Methanol umkristallisiert wird.

**5-[2-(2-Chloroethyl)phenyl]-8-methoxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin-
hydrochlorid (30)**

Ausbeute: 1,1g (80%) weißes Pulver; R_f-Wert: 0,54 (CHCl₃/MeOH 95:5); Smp: 138-139 °C; IR (KBr, cm⁻¹): 1612, 1230, 1126; MG: C₁₈H₁₉Cl₂NO₂ (352 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	50,9	4,61	3,21
Berechnet für C ₁₈ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂ x ¾ CHCl ₃ :	50,9	4,47	3,17

H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.95 – 3.20	m	2 H	Ph-CH ₂
3.70	mc	2 H	CH ₂ -Cl
3.84	s	3 H	O-CH ₃
4.25 – 4.35	m	2 H	OCH ₂ -CH ₂ N
4.65 – 4.75	m	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
6.57	dd (J = 2.5 und 7 Hz)	1 H	H-7
6.67	d (J = 2.5 Hz)	1 H	H-8
7.07	d (J = 9 Hz)	1 H	H-6
7.33	dd (J = 1.5 und 7 Hz)	1 H	H-3'
7.40	ddd (J = 1.5, 7 und 7 Hz)	1 H	H-5'
7.43	dd (J = 1.5 und 7 Hz)	1 H	H-6'
7.58	ddd (J = 1.5, 7 und 7 Hz)	1 H	H-4'

5-[2-(2-Chloroethyl)phenyl]-8-benzyloxy-2,3-dihydro-1,4-benzoxazepin hydrochlorid (48)

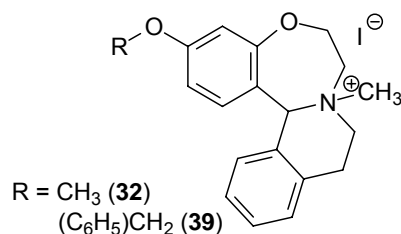
Ausbeute: 1,49 g (87%) weißes Pulver; R_f -Wert: 0,66 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5); Smp: 93 °C; MG: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{NO}_2$ (428 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	55,0	5,07	2,56
Berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{NO}_2 \times \text{CHCl}_3$	54,8	4,42	2,56

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.92 – 3.14	m	2 H	Ph- CH_2
3.65	mc	2 H	$\text{CH}_2\text{-Cl}$
4.17 – 4.25	m	2 H	$\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{N}$
4.63	mc	2 H	$\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}$
5.09	s	2 H	PhCH_2O
6.58	dd ($J = 2.5$ und 7 Hz)	1 H	H-7
6.69	d ($J = 2.5$ Hz)	1 H	H-8
7.02	d ($J = 9$ Hz)	1 H	H-6
7.25 – 7.40	m	8 H	aromat.
7.45 – 7.55	m	1 H	aromat.
14.63	br s	1 H	NH

3-Methoxy-8-methyl-6,7,10,14b-tetrahydro-9*H*-isoquino[2,1-*d*][1,4]-benzoxazepin-8-iumiodid (32)**3-Benzyloxy-8-methyl-6,7,10,14b-tetrahydro-9*H*-isoquino[2,1-*d*][1,4]-benzoxazepin-8-iumiodid (39)**

2 mmol 5-2-(2-Chloroethyl)phenyl-benzoxazepin-hydrochlorid **30** bzw. **48** werden in 30 ml Methanol gelöst. Unter Rühren und Eiskühlung wird portionsweise 1g Natriumborhydrid über eine halbe Stunde zugegeben. Man läßt noch eine halbe Stunde bei RT rühren und engt im Vakuum bis zur sirupösen Konsistenz ein. Der Rückstand wird in 10ml Wasser resuspendiert und dreimal mit jeweils 15ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Als Rückstand verbleibt ein gelbes Öl, das in 10 ml frisch destilliertem Toluol gelöst wird. Zu dieser Lösung tropft man 0,7g (10 mmol) Methyljodid in 4 ml frisch destilliertem Toluol. Die Lösung wird auf 90°C zum Rückfluß erhitzt. Nach ca. 15 min. beginnt ein Feststoff auszufallen. Dieser wird abfiltriert und mit viel Aceton gewaschen.

3-Methoxy-8-methyl-6,7,10,14b-tetra-hydro-9H-isoquino[2,1-d][1,4]benz-oxazepin-8-iumiodid (32)

Ausbeute: 300 mg (35,5 %) blassgelbes Pulver; Smp: 230 °C; MG: C₁₉H₂₂INO₂ (423 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	53,7	5,26	3,26
Berechnet für C ₁₉ H ₂₂ INO ₂	53,9	5,20	3,31

¹H-NMR (500 MHz, d₆-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.44 – 2.55	m	2 H	Ph-CH ₂
3.29	s	3 H	N-CH ₃
3.25 – 3.45	m	3 H	OCH ₂ -CH ₂ N und N-CH ₂
3.60 – 3.70	m	1 H	O-CH ₂ CH ₂ N
3.77	s	3 H	O-CH ₃
3.75 – 3.95	m	1 H	OCH ₂ -CH ₂ N
4.34	mc	1 H	O-CH ₂ CH ₂ N
6.18	s	1 H	Ph-CH-Ph
6.30 – 6.85	m	3 H	aromat.
7.10 – 7.40	m	4 H	aromat.

3-Benzyloxy-8-methyl-6,7,10,14b-tetrahydro-9H-isoquino[2,1-d][1,4]benz-oxazepin-8-iumiodid (39)

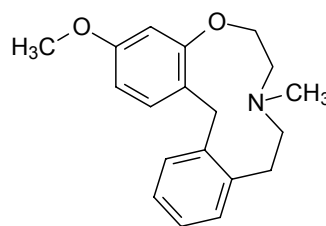
Ausbeute: 350 mg (35 %) gelbes Pulver; Smp: 198 °C; MG: C₂₅H₂₆INO₂ (499 g/mol)
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	59,8	5,21	2,79
Berechnet für C ₂₅ H ₂₆ INO ₂	60,1	5,32	2,80

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.21 – 2.29	m	2 H	Ph-CH ₂
3.28 – 3.40	m	3 H	OCH ₂ -CH ₂ N und N-CH ₂
3.56	s	3 H	N-CH ₃
4.28 – 4.34	m	1 H	O-CH ₂ CH ₂ N
4.35 – 4.40	m	1 H	OCH ₂ -CH ₂ N
4.55	mc	1 H	O-CH ₂ CH ₂ N
5,01	s	2H	Ph-CH ₂ -O
5.89	s	1 H	Ph-CH-Ph
6.63 – 6.77	m	3 H	aromat.
7.29 – 7.35	m	9 H	aromat.

3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenzo[*g*,*j*][1,4]oxa-azacycloundecen (33)



In einen 100 ml 3-Hals-Kolben in einem Bad mit flüssigem Stickstoff werden über 105 mg (0,25 mmol) 3-Methoxy-8-methyl-6,7,10,14b-tetrahydro-9*H*-isoquino[2,1-*d*][1,4]benzoxazepin-8-iumiodid (**32**) und drei Tropfen Ethanol ca. 50 ml Ammoniak einkondensiert. Man nimmt den Kolben aus dem Kühlbad heraus, läßt auf etwa minus 50°C erwärmen und gibt unter Rühren so lange in kleinen Teilen Natrium hinzu, daß die entstehende blaue Farbe genau sieben Minuten bestehen bleibt. Man bricht die Reaktion durch Zutropfen von gesättigter Ammoniumchloridlösung ab, wodurch die blaue Farbe verschwindet. Man läßt weiter bei RT rühren, bis der gesamte Ammoniak verdunstet ist, fügt etwa 30 ml Wasser hinzu und extrahiert dreimal mit jeweils 20 ml Diethylether. Das LM wird über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Das entstandene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂⁶⁰, CHCl₃/MeOH = 95:5).

Ausbeute: 58 mg (78%) weißes Pulver; R_F-Wert: 0,44 (CHCl₃/MeOH 85:15); Smp: 82-83°C; MG: C₁₉H₂₃NO₂ (297 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	76,2	7,91	4,66
Berechnet für C ₁₉ H ₂₃ NO ₂	76,7	7,74	4,71

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.49	s	3 H	N-CH ₃
2.64	t (<i>J</i> = 8 Hz)	2 H	Ph-CH ₂
3.06 und 3.12	2 x mc	4 H	2 x N-CH ₂
3.74	s	3 H	O-CH ₃
3.90 – 4.00	m	2 H	Ph-CH ₂ -Ph
4.15 – 4.20	m	2 H	PhO-CH ₂
6.35	d (<i>J</i> = 2.5 Hz)	1 H	H-4
6.42	dd (<i>J</i> = 3 und 5 Hz)	1 H	H-2
7.0 – 7.15	m	3 H	H-1, H-11 und H-13
7.29	d (<i>J</i> = 9 Hz)	1 H	H-12
7.38	d (<i>J</i> = 6 Hz)	1 H	H-14

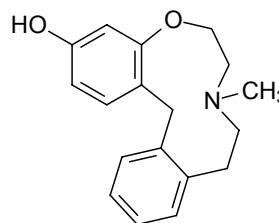
¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung
26.5	Ph-CH ₂
32.3	Ph-CH ₂ -Ph
44.0	N-CH ₃
55.8	PhCH ₂ -CH ₂ N
56.9	O-CH ₃
67.1	OCH ₂ -CH ₂ N
77.0	O-CH ₂ CH ₂ N
99.2	C-4
105.0	C-2
123.0	C-15
126.3	C-12 und C-13
130.4	C-11 und C-14
138.2	C-14a
140.6	C-10a
156.2	C-3
159.5	C-4a

MS: m/z (rel. Int.)

297 (M⁺, 58), 239 (32), 209 (31), 178 (17), 160 (45), 146 (37), 115 (29), 70 (100), 58 (47)

**8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydro-
dibenzo[*g,j*][1,4]oxa-azacycloundecen-
3-ol (40)**



In einen 100 ml 3-Hals-Kolben in einem Bad mit flüssigem Stickstoff werden über 200 mg (0,7 mmol) 3-Benzoyloxy-8-methyl-6,7,10,14b-tetrahydro-9*H*-isoquino[2,1-*dj*][1,4]benzox-azepin-8-iumiodid (**39**) und drei Tropfen Ethanol ca. 50 ml Ammoniak einkondensiert. Man nimmt den Kolben aus dem Kühlbad heraus, läßt auf etwa minus 50°C erwärmen und gibt unter Rühren so lange in kleinen Teilen Natrium hinzu, daß die entstehende blaue Farbe genau sieben Minuten bestehen bleibt. Man bricht die Reaktion ab durch Zutropfen von gesättigter Ammoniumchloridlösung, wodurch die blaue Farbe verschwindet. Man läßt weiter bei RT rühren, bis der gesamte Ammoniak verdunstet ist, und resuspendiert in 30 ml Wasser. Danach wird die wäßrige Phase mit 2N HCl auf einen pH-Wert von etwa 9-10 eingestellt und nochmals dreimal mit jeweils 20 ml Diethylether extrahiert. Das LM wird über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Das entstandene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂⁶⁰, CHCl₃/MeOH = 95:5).

Ausbeute: 9 mg (4,5%) gelbes Harz; R_f-Wert: 0,77 (Diethylether); MG: C₁₈H₂₀NO₂ (282 g/mol)

GC/MS:

Hauptprodukt (95,2%) bei Rt: 23,69 min. (Split: 1:2, Injektor: 250°C, Detektor: 280°C, Anfangstemperatur: 90°C, Heizrate: 10°C/min. bis 260°C, dort noch für 18 min. verweilend) mit folgender MS-Detektion: m/z (rel. Int.): 283 (M⁺, 49), 225 (12), 207 (80), 195 (28), 178 (19), 160 (36), 146 (28), 115 (29), 70 (100), 57 (42)

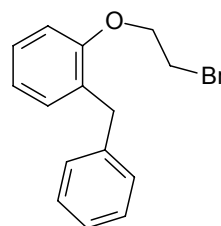
¹H-NMR (250 MHz, d₆-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.39	s	3 H	N-CH ₃
2.51	mc	2 H	Ph-CH ₂
3.00	mc	4 H	2 x N-CH ₂
3.82	mc	2 H	Ph-CH ₂ -Ph
4.03 – 4.10	m	2 H	PhO-CH ₂
6.27-6.33	m	2 H	H-4 und H-2
7.04 – 7.13	m	3 H	H-1, H-11 und H-13
7.22	d (J = 9 Hz)	1 H	H-12
7.39-7.45	m	1 H	H-14

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung
25.7	Ph-CH ₂
31.2	Ph-CH ₂ -Ph
43.2	N-CH ₃
56.4	PhCH ₂ -CH ₂ N
62.8	OCH ₂ -CH ₂ N
66.9	O-CH ₂ CH ₂ N
99.6	C-4
175.1	C-2
120.4	C-15
125.8	C-12 und C-13
130.3	C-11 und C-14
138.6	C-14a
140.3	C-10a
156.1	C-3
157.2	C-4a

**2-Benzylphenyl- 2-bromo-
ethylether (50)**



Die Darstellung erfolgt nach AAV 1 aus 2-Benzylphenol und 2-Bromoethanol, die Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch (SiO₂⁶⁰, CHCl₃/MeOH 95:5), der erhaltene weiße Feststoff wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 42% weiße Kristalle; R_f -Wert: 0,81 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5); Smp: 82-83°C;
 MG: $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{OBr}$ (290 g/mol)

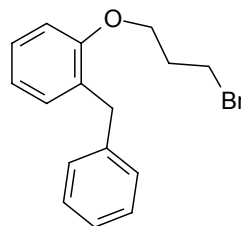
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	62,1	5,22	-
Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{BrO}$:	62,1	5,17	-

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.56	t ($J = 6$ Hz)	2 H	$\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{Br}$
3.99	s	2 H	$\text{Ph-CH}_2\text{-Ph}$
4.24	t ($J = 6$ Hz)	2 H	$\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$
6.80	d ($J = 7$ Hz)	1 H	aromat.
6.88 – 6.92	m	1 H	aromat.
7.10 – 7.26	m	7 H	aromat.

2-Benzylphenyl-2-bromopropylether (58)



Darstellung nach AAV 1 aus 2-Benzylphenol und 2 – Bromopropanol, das erhaltene ölige farblose Rohprodukt erstarrt über Nacht im Kühlschrank und wird aus Ethanol umkristallisiert.

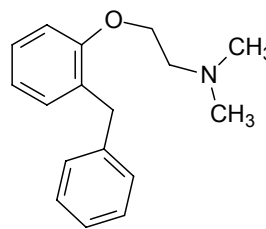
Ausbeute: 44% weiße Kristalle; R_f -Wert: 0,82 (Toluen/ MeOH : 95:5); Smp: 26°C;
 MG: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{OBr}$ (305 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	60,1	5,91	-
Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{BrO} \times \text{H}_2\text{O}$:	60,2	5,57	-

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.08-2.20	2 x t (überl.)	2 H	$\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$
3.33	t ($J = 6.5$ Hz)	2 H	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{Br}$
3.89	s	2 H	$\text{Ph-CH}_2\text{-Ph}$
3.99	t ($J = 5.5$ Hz)	2 H	$\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$
6.77 – 6.86	m	2 H	aromat.
7.00 – 7.28	m	7 H	aromat.

2-(2-Benzylphenoxy)-N,N-dimethylethanamin (51)

Die Darstellung erfolgt nach AAV 2 aus 2-Benzylphenyl-2-bromoethylether (**50**) und *N,N*-dimethylamin, der gelbe, ölige Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2^{60} , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 95:5$).

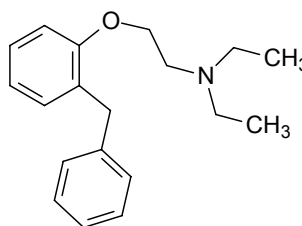
Ausbeute: 63% gelbes Öl; R_f -Wert: 0,26 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} 95:5$); Smp: 103°C (Hydrochlorid), Lit.: 117-120°C^[50]; MG: $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}$ (255 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	77,7	8,06	5,30
Berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO} \times \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$:	77,3	8,33	5,30

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.29	s	6 H	2 x NCH_3
2.68	t ($J = 6 \text{ Hz}$)	2 H	$\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{N}$
3.94	s	2 H	$\text{Ph-CH}_2\text{-Ph}$
4.04	t ($J = 6 \text{ Hz}$)	2 H	$\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}$
6.83 – 6.87	m	2 H	aromat.
7.05 – 7.07	m	1 H	aromat.
7.13 – 7.26	m	6 H	aromat.

2-(2-Benzylphenoxy)-N,N-diethylethanamin (52)

Die Darstellung erfolgt nach AAV 2 aus 2-Benzylphenyl-2-bromoethylether (**50**) und *N,N*-diethylamin, die Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch (SiO_2^{60} , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} 95:5$).

Ausbeute: 43% gelbes Öl; R_f -Wert: 0,3 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} 95:5$); Smp.: 153°C (Hydrochlorid), Lit.: 158-159°C^[50]; MG: $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}$ (283 g/mol)

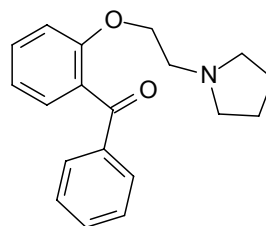
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	80,5	8,89	4,94
Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}$:	80,5	8,88	5,05

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.04	t (<i>J</i> = 6 Hz)	6 H	2 x NCH ₂ -CH ₃
2.61	q (<i>J</i> = 7 Hz)	4 H	2 x N-CH ₂ CH ₃
2.85	t (<i>J</i> = 6 Hz)	2 H	OCH ₂ -CH ₂ N
3.97	s	2 H	Ph-CH ₂ -Ph
4.04	t (<i>J</i> = 6 Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
6.84 – 6.87	m	2 H	aromat.
7.05	d (<i>J</i> = 6 Hz)	1 H	aromat.
7.14 – 7.26	m	6 H	aromat.

Phenyl-[2-(2-pyrrolidin-1-yl-ethoxy)-phenyl]-methanon (60)



Die Darstellung erfolgt nach AAV 1 aus 2-Hydroxybenzophenon und *N*-(2-Hydroxyethyl)-pyrrolidin, die Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch (SiO₂⁶⁰, CH₂Cl₂/MeOH 70:30).

Ausbeute: 10% gelbes Öl; *R_f* - Wert: 0,30 (CH₂Cl₂/MeOH 70:30); IR (KBr, cm⁻¹): 2960, 1665, 1598; MG: C₁₉H₂₁NO₂ (295 g/mol)

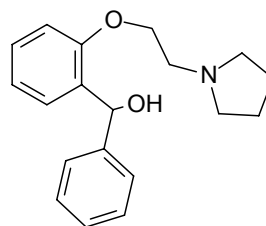
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	75,4	7,18	4,75
Berechnet für C ₁₉ H ₂₁ NO ₂ x ½ MeOH:	75,2	7,39	4,50

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.66	mc	4 H	2 x NCH ₂ -CH ₂ (Pyrrolidin)
2.37	mc	4 H	2 x N-CH ₂ CH ₂ (Pyrrolidin)
2.58	t (<i>J</i> = 6 Hz)	2 H	OCH ₂ -CH ₂ N
4.06	t (<i>J</i> = 6 Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
6.96 – 7.09	m	2 H	aromat.
7.38 – 7.58	m	5 H	aromat.
7.76 – 7.80	m	2 H	aromat.

Phenyl-[2-(2-pyrrolidin-1-yl-ethoxy)-phenyl]-methanol (61)



Zu einer Suspension von 18mg (0,5 mmol) LiAlH_4 in 30 ml trockenem Ether tropft man unter ständigem Rühren eine Lösung von 0,5g (1,7 mmol) Phenyl-[2-(2-pyrrolidin-1-yl-ethoxy)-phenyl]-methanon (**60**) in 10 ml trockenem Ether so zu, dass der Ether mässig siedet. Nach Beenden des Zutropfens rührt man noch 2 h bei RT. Nach Abkühlen gibt man tropfenweise unter Rühren und Eiskühlung solange Eiswasser zu, bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu beobachten ist. Der entstehende Niederschlag wird mit einigen Tropfen 10% H_2SO_4 aufgelöst. Die Lösung wird in einen Scheidetrichter überführt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird noch dreimal mit jeweils 20 ml Ether ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum vom LM befreit. Es verbleibt ein weißer Feststoff als Rückstand.

Ausbeute: 190 mg (38%) weißes Pulver; R_f -Wert: 0,22 (MeOH/Aceton 2:1); Smp: 115°C; IR (KBr, cm^{-1}): 3409, 2952, 1597; MG: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ (297 g/mol)

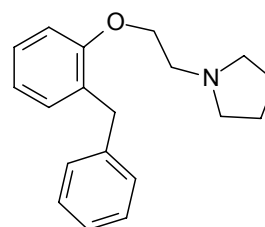
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	74,2	7,62	4,19
Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2 \times \frac{3}{4} \text{H}_2\text{O}$ (310,9):	73,8	7,45	4,53

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.18	s	1 H	OH
1.75	mc	4 H	2 x $\text{NCH}_2\text{-CH}_2$ (Pyrrolidin)
2.49	m	4 H	2 x $\text{N-CH}_2\text{CH}_2$ (Pyrrolidin)
2.64 – 2.76	m	2 H	$\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{N}$
4.07 – 4,10	m	2 H	$\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}$
5.87	s	1 H	Ph-CHOH-Ph
6.83 – 6.86	m	2 H	aromat.
6.98	d ($J = 6$ Hz)	1 H	aromat.
7.14 – 7.17	m	2 H	aromat.
7.25	t ($J = 7$ Hz)	2 H	aromat.
7.32	d ($J = 8$ Hz)	2 H	aromat.

1-[2-(2-Benzylphenoxy)-ethyl]-pyrrolidin (53**)**



Die Darstellung erfolgt nach AAV 2 aus 2-Benzylphenyl-2-bromoethylether (**50**) und Pyrrolidin, das erhaltene Öl ist bereits DC-rein und bedarf keiner weiteren Reinigung.

Ausbeute: 72% gelbes Öl, das in der Kälte auskristallisiert.; R_f -Wert: 0,38 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5); Smp: 139-140°C (Hydrochlorid), Lit.: 140-141,5°C^[50]; MG: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}$ (281 g/mol)

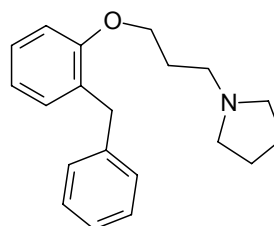
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	70,4	7,54	4,52
Berechnet für $C_{19}H_{23}NO \times HCl \times \frac{1}{4} H_2O$:	70,7	7,60	4,34

 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.83	mc	4 H	2 x NCH_2-CH_2 (Pyrrolidin)
2.65	mc	4 H	2 x $N-CH_2CH_2$ (Pyrrolidin)
2.93	t ($J = 6$ Hz)	2 H	OCH_2-CH_2N
4.05	s	2 H	$Ph-CH_2-Ph$
4.16	t ($J = 6$ Hz)	2 H	$O-CH_2CH_2N$
6.91 – 6.95	m	2 H	aromat.
7.13	d ($J = 7.5$ Hz)	1 H	aromat.
7.21 – 7.33	m	6 H	aromat.

1-[2-(2-Benzylphenoxy)-propyl]-pyrrolidin (59)



Die Darstellung erfolgt nach AAV 2 aus 2-Benzylphenyl-2-bromopropylether (**58**) und Pyrrolidin, der gelbe, ölige Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2^{60} , $CHCl_3/MeOH = 95:5$).

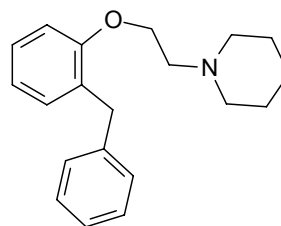
Ausbeute: 70% farbloses Öl; R_f -Wert: 0,31 ($CHCl_3/MeOH$ 90:10); Smp: 138°C (Hydrochlorid); MG: $C_{20}H_{25}NO$ (295 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	81,4	8,56	4,81
Berechnet für $C_{25}H_{28}NO_2$:	81,3	8,53	4,74

 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.78	mc	4 H	2 x NCH_2-CH_2 (Pyrrolidin)
1.94 – 2.01	m	2 H	$OCH_2-CH_2CH_2N$
2.46 – 2.56	m	6 H	2 x $N-CH_2CH_2$ (Pyrrolidin) und $OCH_2CH_2-CH_2N$
3.97 – 4.03	s und t ($J = 6$ Hz), überlagert	4 H	$Ph-CH_2-Ph$ und $O-CH_2CH_2CH_2N$
6.87	t ($J = 7$ Hz)	2 H	aromat.
7.09 – 7.29	m	7 H	aromat.

1-[2-(2-Benzylphenoxy)-ethyl]-piperidin (54)

Die Darstellung erfolgt nach AAV 2 aus 2-Benzylphenyl-2-bromoethylether (**50**) und Piperidin, das erhaltene Öl ist DC-rein und bedarf keiner weiteren Reinigung.

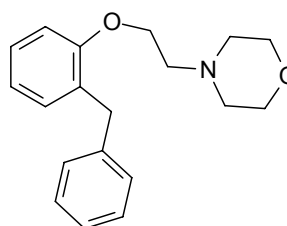
Ausbeute: 93% farbloses Öl; R_f -Wert: 0,51 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10); Smp: 129-130°C (Hydrochlorid), Lit.: 139-141°C^[50]; MG: $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}$ (295 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	80,0	8,36	4,80
Berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO} \times 1/4 \text{ H}_2\text{O}$ (299,9) :	80,0	8,42	4,67

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.41-1.54	m	2 H	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ (Piperidin)
1.55-1.68	m	4 H	2 x NCH_2 (Piperidin)
2.45-2.55	m	4 H	2 x NCH_2CH_2 ((Piperidin))
2.79	t ($J = 6 \text{ Hz}$)	2 H	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$
4.01	s	2 H	$\text{Ph-CH}_2\text{-Ph}$
4.13	t ($J = 6 \text{ Hz}$)	2 H	$\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}$
6.86 – 6.95	m	2 H	aromat.
7.09 – 7.34	m	7 H	aromat.

1-[2-(2-Benzylphenoxy)-ethyl]-morpholin (55)

Die Darstellung erfolgt nach AAV 2 aus 2-Benzylphenyl-2-bromoethylether (**50**) und Morpholin, das erhaltene Öl ist DC-rein und bedarf keiner weiteren Reinigung.

Ausbeute: 97% farbloses Öl; R_f -Wert: 0,40 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10); Smp: 175-176°C (Hydrochlorid), (Lit.: 184-185°C^[50]); MG: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ (297 g/mol)

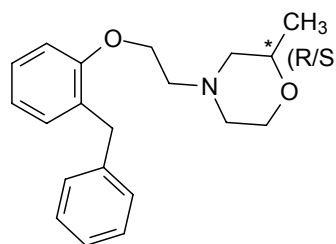
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	73,3	7,45	4,77
Berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{NO}_2 \times 3/4 \text{ H}_2\text{O}$ (310,5) :	73,3	7,72	4,50

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.51	mc	4 H	2 x NCH ₂ (Morpholin)
2.77	t (<i>J</i> = 5.5 Hz)	2 H	OCH ₂ -CH ₂ N
3.68	mc	4 H	2 x OCH ₂ (Morpholin)
3.99	s	2 H	Ph-CH ₂ -Ph
4.10	t (<i>J</i> = 5.5 Hz)	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
6.85 – 6.94	m	2 H	aromat.
7.11 – 7.30	m	7 H	aromat.

4-[2-(2-Benzylphenoxy)ethyl]-2-methylmorpholin (56)



Die Darstellung erfolgt nach AAV 2 aus 2-Benzylphenyl-2-bromoethylether (**50**) und racemischem 2-Methylmorpholin, das erhaltene Öl ist DC-rein und bedarf keiner weiteren Reinigung.

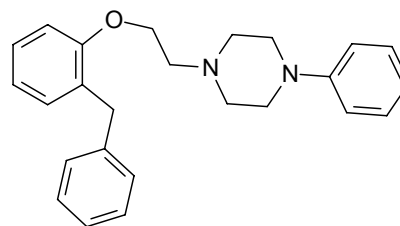
Ausbeute: 96% farbloses Öl; *R_f*-Wert: 0,53 (CHCl₃/MeOH 95:5); MG: C₂₀H₂₅NO₂ (311 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	76,2	7,94	4,56
Berechnet für C ₂₀ H ₂₅ NO ₂ x ¼ H ₂ O:	76,0	7,99	4,43

¹H-NMR (250 MHz):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.22	d (<i>J</i> = 6 Hz)	3 H	NCH ₂ CH-(CH ₃)O (Morpholin)
1.90 – 1.99	m	1 H	N-CH ₂ CH(CH ₃)O (Morpholin)
2.17 – 2.28	m	1 H	N-CH ₂ CH(CH ₃)O (Morpholin)
2.64 – 2.85	m	4 H	OCH ₂ -CH ₂ N und N-CH ₂ CH ₂ O (Morpholin)
3.53 – 3.69	m	2 H	N-CH ₂ CH ₂ O (Morpholin)
3.74 – 3.85	m	1 H	N-CH ₂ -CH(CH ₃)O (Morpholin)
3.98	s	2 H	Ph-CH ₂ -Ph
4.03 – 4.14	m	2 H	O-CH ₂ CH ₂ N
6.80 – 6.94	m	2 H	aromat.
7.05 – 7.27	m	7 H	aromat.

1-[2-(2-Benzylphenoxy)ethyl]-4-phenylpiperazin (57)

Die Darstellung erfolgt nach AAV 2 aus 2-Benzylphenyl-2-bromoethylether (**50**) und *N*-phenylpiperazin, der gelbe, ölige Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2^{60} , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 95:5$). Das Produkt erstarrt nach einigen Tagen im Kühlschrank und wird aus Ethanol umkristallisiert.

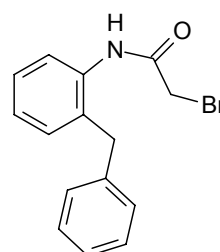
Ausbeute: 74% blassgelbes Pulver; R_f -Wert: 0,64 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} 95:5$); Smp: 57-58°C; MG: $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{NO}_2$ (372 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	79,2	7,09	6,03
Berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{NO}_2 \times \frac{1}{4} \text{H}_2\text{O}$ (376,5):	79,6	7,49	7,43

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.68	mc	4 H	2 x $\text{PhN-CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ (Piperazin)
2.83	t ($J = 6$ Hz)	2 H	$\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{N}$
3.16	mc	4 H	2 x $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ (Piperazin)
4.00	s	2 H	$\text{Ph-CH}_2\text{-Ph}$
4.14	t ($J = 6$ Hz)	2 H	$\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}$
6.81 – 6.93	m	4 H	aromat.
7.11 – 7.29	m	10 H	aromat.

***N*-(2-Benzylphenyl)-2-bromoacetamid (62)**

Eine Lösung von 5,64g (36 mmol) Bromacetyl bromid in 100ml wasserfreiem Diethylether wird tropfenweise unter Rühren und Eiskühlung zu einer Lösung von 13,2g (72 mmol) 2-Benzylanilin in 100ml wasserfreiem Diethylether gegeben. Die Lösung wird 2 h bei RT gerührt, währenddessen ein weißer Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert, in 100 ml Chloroform gelöst und dreimal mit jeweils 20 ml 2N Salzsäure ausgeschüttelt. Das LM wird im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 5,2g (50%) weiße Nadeln; R_f -Wert: 0,60 (Toluen/MeOH 90:10); Smp: 132°C; MG: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{BrN}$ (288 g/mol)

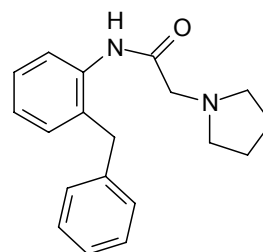
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	61,7	4,82	4,85
Berechnet für C ₁₅ H ₁₄ Br N	59,2	4,64	4,60

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.90	s	2 H	Ph-CH ₂ -Ph
4.03	s	2 H	CO-CH ₂ Br
7.14 – 7.36	m	8 H	aromat.
7.84	d (J = 7.6 Hz)	1 H	H-3
7.89	br s	1 H	NH

***N*-(2-Benzylphenyl)-2-pyrrolidin-1-ylacetamid (63)**



Die Darstellung erfolgt nach AAV 2 aus *N*-(2-benzylphenyl)-2-bromoacetamid (**62**) und Pyrrolidin. Das erhaltene ölige Rohprodukt erstarrt nach einigen Stunden in der Kälte und wird aus Ethanol umkristallisiert.

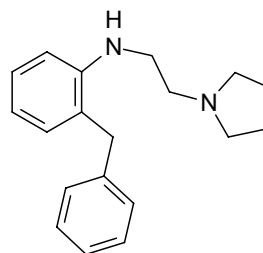
Ausbeute: 42% weiße Kristalle; R_f-Wert: 0,78 (CHCl₃/MeOH 95:5); Smp: 95-96°C; MG: C₁₉H₂₂N₂O (294 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	77,5	7,53	9,48
Berechnet für C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	77,5	7,53	9,52

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.67	mc	4 H	2 x NCH ₂ -CH ₂ (Pyrrolidin)
2.51	mc	4 H	2 x N-CH ₂ CH ₂ (Pyrrolidin)
3.18	s	2 H	CO-CH ₂ N
3.99	s	2 H	Ph-CH ₂ -Ph
7.06 - 7.35	m	8 H	aromat.
8.14	d (J = 8 Hz)	1 H	aromat.
9.16	s (br)	1 H	NH

***N*-(2-Benzylphenyl)-*N*-(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amin (64)**

Zu einer Suspension von 0,3g (8 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 25 ml trockenem THF werden 0,5g (1,75 mmol) *N*-(2-benzylphenyl)-2-pyrrolidin-1-ylacetamid (**63**), gelöst in 15 ml trockenem THF, unter Rühren und Eiskühlung langsam zugetropft. Man rührt noch weitere 3h unter Rückfluß, läßt abkühlen, und gibt tropfenweise langsam 10 ml Wasser unter Eiskühlung hinzu. Nach Zugabe von 30 ml Toluol trennt man die wäßrige Phase ab und wäscht sie noch dreimal mit jeweils 20 ml Toluol. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Es verbleibt als Rohprodukt ein gelb-braunes Öl, das säulenchromatographisch (SiO_2^{60} , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 95:5$) gereinigt wird.

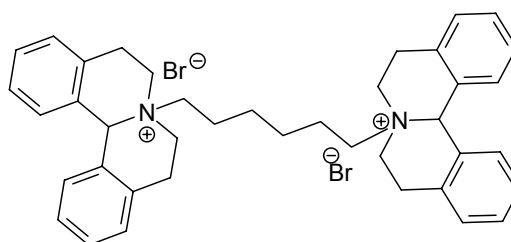
Ausbeute: 150 mg (31%) gelbes Öl; R_f -Wert: 0,48 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} 95:5$); Smp: 154°C (Dihydrochlorid); IR (KBr, cm^{-1}): 3416, 2960, 1492, 1448; MG: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2$ (280 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	64,4	7,39	7,78
Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2 \times 2 \text{ HCl}$ (353,3)	64,6	7,42	7,93

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.18	s	1 H	NH
1.61	mc	4 H	2 x $\text{NCH}_2\text{-CH}_2$ (Pyrrolidin)
2.35	mc	4 H	2 x $\text{N-CH}_2\text{CH}_2$ (Pyrrolidin)
2.59	t ($J = 6 \text{ Hz}$)	2 H	$\text{NHCH}_2\text{-CH}_2\text{N}$
3.07	mc	2 H	$\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{N}$
3.80	s	2 H	$\text{Ph-CH}_2\text{-Ph}$
6.54 – 6.66	m	2 H	aromat.
6.98	d ($J = 7.5 \text{ Hz}$)	1 H	aromat.
7.07 – 7.18	m	6 H	aromat.

7,7'-Hexylen-bis-5,6,8,9,13b,13c-hexahydro-4a-*H*-isochino[1,2-*a*]-isochinolium-dibromid (68)

Zu einer Lösung von 2,8g (11,9 mmol) Dibenzo-5,6,8,9-tetrahydro-13b*H*-[a,h]chinolizin (**67**) in 50 ml wasserfreiem Toluol werden 1,5g (6 mmol) Dibromhexan, gelöst in 10 ml wasserfreiem Toluol, langsam zugetropft. Die Lösung wird bei 90°C über Nacht gerührt. Der entstandene weiße Niederschlag wird abfiltriert, und mit Aceton gewaschen.

Ausbeute: 1,52g (35%) weißes Pulver; Smp: 224 °C; MG: C₄₀H₄₆N₂Br₂ (714 g/mol)

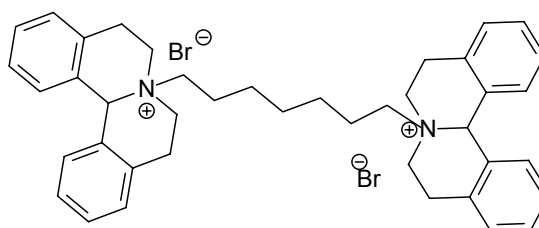
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	58,0	5,78	3,22
Berechnet für C ₄₀ H ₄₆ N ₂ Br ₂ x: H ₂ O	58,1	5,93	3,45

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.51	mc	4 H	N(CH ₂) ₂ -CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂ N
2.28	mc	4H	NCH ₂ -CH ₂ (CH ₂) ₂ -CH ₂ CH ₂ N
3.15 – 3.25	m	4 H	Ph-CH ₂ CH ₂
3.30 – 3.40	m	4 H	Ph-CH ₂ CH ₂
3.82	mc	4 H	N-CH ₂ (CH ₂) ₄ -CH ₂ N
4.04	mc	4 H	PhCH ₂ -CH ₂
4.42 – 4.46	m	4 H	PhCH ₂ -CH ₂
5.98	s	2 H	Ph-CH-Ph
7.09	d	4 H	H4, H4', H10, H10'
7.26 – 7.38	m	12 H	aromat.

**7,7'-Heptylen-bis-
5,6,8,9,13b,13c-hexa-
hydro- 4a-*H*-isochino[1,2-
a]isochino-linium-dibromid
(68)**



Zu einer Lösung von 3g (13,1 mmol) Dibenzo-5,6,8,9-tetrahydro-13b*H*-[a,h]chinolizin (**67**) in 50 ml wasserfreiem Toluol werden 1,67g (6,5 mmol) Dibromheptan, gelöst in 10 ml wasserfreiem Toluol, langsam zugetropft. Die Lösung wird bei 90°C über Nacht gerührt. Der erhaltene weiße Niederschlag wird abfiltriert, und mit Aceton gewaschen

Ausbeute: 1,8g (38%) weißes Pulver; Smp: 221 °C; MG: C₄₁H₄₈N₂Br₂ (728 g/mol)

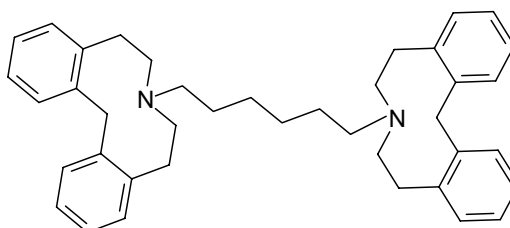
Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	62,3	6,69	3,51
Berechnet für C ₄₁ H ₄₈ N ₂ Br ₂ :	60,2	6,14	3,34

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.1 – 1.4	m	8 H	NCH ₂ -(CH ₂) ₂ CH ₂ -(CH ₂) ₂ CH ₂ N
1.34	mc	2 H	N(CH ₂) ₃ -CH ₂ (CH ₂) ₃ N
3.16 – 3.31	m	8 H	Ph-CH ₂ CH ₂
3.38	mc	4 H	N-CH ₂ (CH ₂) ₅ -CH ₂ N
3.70 – 3.90	m	8 H	Ph-CH ₂ CH ₂
5.79	s	2 H	Ph-CH-Ph
7.12	d	4 H	H4, H4', H10, H10'
7.20 – 7.48	m	12 H	aromat.

7,7'-Hexylen-bis-5,6,8,9,14-hexahydro-dibenzo [d,g]azecin (66)



In einen 100 ml 3-Hals-Kolben, der sich in einem Bad mit flüssigem Stickstoff befindet, werden über 1,5 g (1,8 mmol) 7,7'-Hexylen-bis-5,6,8,9,13b,13c-hexahydro-4a*H*-iso chino[1,2a]isochinolinium-dibromid (**68**) und drei Tropfen Ethanol ca. 50 ml Ammoniak einkondensiert. Man nimmt den Kolben aus dem Kühlbad heraus, läßt auf etwa minus 50°C erwärmen und gibt unter Rühren so lange in kleinen Teilen Natrium hinzu, daß die entstehende blaue Farbe bestehen bleibt. Man bricht die Reaktion nach genau 15 min. durch Zutropfen von gesättigter Ammoniumchloridlösung ab, wodurch die blaue Farbe verschwindet. Man läßt weiter bei RT rühren, bis der gesamte Ammoniak verdunstet ist, fügt etwa 30 ml Wasser hinzu und extrahiert dreimal mit jeweils 20 ml Diethylether. Das LM wird über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Das entstandene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂⁶⁰, CHCl₃/MeOH = 95:5).

Ausbeute: 0,6 g (59%) braunes Öl; R_f-Wert: 0,61 (CHCl₃/MeOH 95:5);
MG: C₄₀H₄₈N₂ (556 g/mol)

Elementaranalyse:

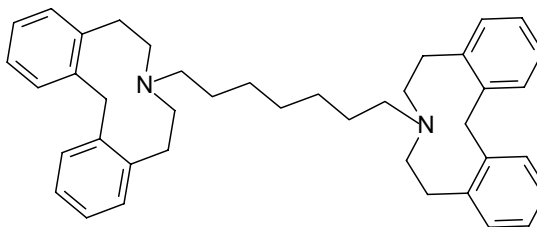
	C	H	N
Gefunden:	81,3	7,83	4,73
Berechnet für C ₄₀ H ₄₈ N ₂ x: 2 H ₂ O	81,0	8,87	4,74

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.91 – 0.96	m	4 H	N(CH ₂) ₂ -CH ₂ CH ₂ -(CH ₂) ₂ N
1.16 – 1.22	m	4 H	NCH ₂ -CH ₂ (CH ₂) ₂ -CH ₂ CH ₂ N
2.32	mc	4 H	N-CH ₂ (CH ₂) ₄ -CH ₂ N
2.64 – 2.75	m	16 H	Ph-CH ₂ -CH ₂
4.45	bs	4 H	Ph-CH ₂ -Ph

7.02 – 7.05	m	4 H	H4, H4', H10, H10'
7.08 – 7.13	m	8 H	aromat.
7.26 – 7.30	m	4 H	aromat.

7,7'-Heptylen-bis-5,6,8,9,14-hexahydro-dibenzo[d,g]azecin (66)



In einen 100 ml 3-Hals-Kolben, der sich in einem Bad mit flüssigem Stickstoff befindet, werden über 1,5 g (2 mmol) 7,7'-Heptylen-bis-5,6,8,9,13b,13c-hexahydro-4a*H*-isochino[1,2a]isochinolinium-dibromid (**68**) und drei Tropfen Ethanol ca. 50 ml Ammoniak einkondensiert. Man nimmt den Kolben aus dem Kühlbad heraus, läßt auf etwa minus 50°C erwärmen und gibt unter Rühren so lange in kleinen Teilen Natrium hinzu, daß die entstehende blaue Farbe bestehen bleibt. Man bricht die Reaktion nach genau 15 min. durch Zutropfen von gesättigter Ammoniumchloridlösung ab, wodurch die blaue Farbe verschwindet. Man läßt weiter bei RT rühren, bis der gesamte Ammoniak verdunstet ist, fügt etwa 30 ml Wasser hinzu und extrahiert dreimal mit jeweils 20 ml Diethylether. Das LM wird über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Das entstandene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂⁶⁰, CHCl₃/MeOH = 95:5).

Ausbeute: 0,63 g (55%) braunes Öl; R_f-Wert: 0,53 (CHCl₃/MeOH 95:5);
MG: C₄₁H₅₀N₂ (570 g/mol)

Elementaranalyse:

	C	H	N
Gefunden:	70,2	8,24	3,70
Berechnet für C ₄₁ H ₅₀ N ₂ x:3 H ₂ O	70,6	8,41	4,03

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.84	mc	6 H	N(CH ₂) ₂ -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -(CH ₂) ₂ N
1.19	mc	4 H	NCH ₂ -CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ -CH ₂ N
2.33	mc	4 H	N-CH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₂ -N
2.76	mc	16 H	Ph-CH ₂ -CH ₂
4.38	bs	4 H	Ph-CH ₂ -Ph
7.00 – 7.04	m	16 H	aromat.

10 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
aromat.	aromatisch
B _{max}	Maximale Bindungskapazität
br s	verbreitertes Singulett
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
cDNA	coding desoxyribonucleic acid
CHO	Chinese Hamster Ovaries
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett vom Dublett
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dpm	decays per minute (Zerfälle pro Minute)
dt	Dublett vom Triplett
D _x -Rezeptoren	Dopamin-Rezeptorsubtypen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOAc	Ethylacetat
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC/MS	GC mit Massendetektion
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde(n)
hD _x -Rezeptoren	humane Dopamin-Rezeptorsubtypen
HEK	Human Embryonic Kidney
5-HT	5-Hydroxytryptamin
Hz	Hertz
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
KBr	Kaliumbromid
Kap.	Kapitel
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
K _i	Gleichgewichtsinhibitionskonstante
konz.	konzentriert
l	Liter
liq.	liquid (flüssig)
LM	Lösungsmittel
log	logarithmisch
Lsg.	Lösung

μM	mikromolar
m	Multipllett
mc	zentriertes Multipllett
Mel	Methyliodid
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHz	Megahertz
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MS	Massenspektroskopie
N	Normal
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmt
nM	nanomolar
NMR	Nuclear Magnetic resonance
PBS	Phosphate buffered saline
Ph	Phenyl
ppm	parts per million
q	Quartett
Rt	Retention time
RT	Raumtemperatur
R _f	Retentionsfaktor
s	Singulett
s.	siehe
Sdp.	Siedepunkt
sec.	Sekunden
SiO ₂ ⁶⁰	Kieselgel, 60 Mesh
Smp.	Schmelzpunkt
t	Tripllett
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
TPP	Triphenylphosphin
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

11 Literaturverzeichnis

- [1] Thews, G.; Mutschler, E. and Vaupel, P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*; Wiss. Verlagsgesellschaft: 1999; p 694.
- [2] International Classification of Diseases, ICD-10. WHO;1991;
<http://www.who.int/whosis/icd10/>
- [3] Möller, H.; Laux, G.; Kapitany, T. and Kapfhammer, H. *Psychiatrie und Psychotherapie*; Springer Verlag: 2003; pp 1049 ff.
- [4] Bondy, B. Das Krankheitsbild der Schizophrenie. *Pharmazie in unserer Zeit* **2002**, 31, 530-536.
- [5] Kornhuber, J. and Weller, M. Aktueller Stand der biochemischen Hypothesen zur Pathogenese der Schizophrenien. *Nervenarzt* **1994**, 65, 741-754.
- [6] Carlsson, A. Does dopamine have a role in schizophrenia. *Biol Psychiatr* **1978**, 13, 3-21.
- [7] Keabadian, J. and Calne, D. Multiple receptors for dopamine. *Nature* **1979**, 277, 93-96.
- [8] Andersen, P. Dopaminrezeptoren und Schizophrenie: Bedeutung der D1- und D5-Rezeptoren. In *Schizophrenie*. Gerlach, J. Ed.; Springer Verlag: 1995; pp 49-69.
- [9] Andersen, P. and Nielsen, E. Novel approaches to development of antipsychotics. *DN&P* **1991**, 4, 150-157.
- [10] Mutschler, E. *Arzneimittelwirkungen*; Wiss. Verlagsgesellschaft: 2001; pp 160 ff.
- [11] Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Förstermann, U. and Starke, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Urban und Fischer Verlag München und Jena: 2001; pp 339 ff.
- [12] Strange, P. Importance of Dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev* **2001**, 78, 119-133.
- [13] Müller, E. Wirkungsmechanismen der atypischen Neuroleptika. *Pharmazie in unserer Zeit* **2002**, 31, 537-544.
- [14] Müller, N. and Riedel, M. Weniger Nebenwirkungen! Therapie mit atypischen Neuroleptika. *Pharmazie in unserer Zeit* **2002**, 31, 558-564.
- [15] Missale, C.; Russel, N.; Robinson, S.; Jaber, M.; and Caron, M. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* **1998**, 78, 189-225.
- [16] Niznik, H.; Sunahara, R.; Pristupa, Z. and Jarvie, K. Molekulare Grundlagen der Interaktion zwischen Dopamin-(D1-/D2-) Rezeptoren. In *Schizophrenie*. Gerlach, J. Ed.; Springer Verlag: 1995; pp 1-29.

- [17] Webster, R. Dopamine. In *Neurotransmitters, drugs and brain function*. 1 ed.; Webster, R. Ed.; Wiley: 2001; pp 137-162.
- [18] Pollock, N.; Manelli, H.; Hutchins, C.; Steffey, M.; Mac Kenzie, R. and Frail, D. Serine mutations in transmembrane domain V of the Dopamine D1 receptor affect ligand interactions and receptor activation. *J Biol Chem* **1992**, 267, 17780-17786.
- [19] Gibb, A. Neurotransmitter receptors. In *Neurotransmitters, drugs and brain function*. 1 ed.; Webster, R. Ed.; Wiley: 2001; pp 57-79.
- [20] Roth, B. Ki-database Psychoactive drug screening programme. National institute of Mental Health (NIMH). 2003.
- [21] Bourne, J. SCH 23390: The first selective Dopamine D1-like receptor antagonist. *CNS Drug Reviews* **2001**, 7, 399-414.
- [22] Rowley, M.; Bristow, L. and Hutson, P. Current and novel approaches to the drug treatment of schizophrenia. *J Med Chem* **2001**, 44, 477-501.
- [23] Keabadian, J.; Tarazi, F.; Kula, N. and Baldessarini, R. Compounds selective for dopamine receptor subtypes. *DDT* **1997**, 2, 333-340.
- [24] Witt, T.; Hock, F. and Lehmann, J. 7-Methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-benz[d]indolo[2,3-g]azecine: a new heterocyclic system and a new lead compound for dopamine receptor antagonists. *J Med Chem* **2000**, 43, 2079-2081.
- [25] Kassack, M.; Höfgen, B.; Decker, M.; Eckstein, N. and Lehmann, J. Pharmacological characterization of the benz[d]indolo[2,3-g]azecine LE 300, a novel type of nanomolar dopamine receptor antagonist. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **2002**, 366, 543-550.
- [26] Höfgen, B. Etablierung eines funktionellen Calcium-assays und seine Anwendung zum Screening potentieller Liganden an humanen, klonierten Dopamin-Rezeptoren. *Dissertation Bonn* **2001**.
- [27] Decker, M. Synthese und pharmakologische Evaluierung strukturell neuartiger Dopamin-Rezeptor-Liganden vom Azecin- und Azepin-Typ. *Dissertation Bonn* **2001**.
- [28] Rostom, S.; Farghaly, M.; Soliman, F.; El Semaary, M.; Elz, S. and Lehmann, J. Synthesis and 5-HT_{2A} antagonist activity of derivatives of the novel heterocycles indolo[3,2-d]azecine and benz[d]pyrrolo[3,2-g]azecine compared to the benz[d]indolo[2,3-g]azecine LE 300. *Arch Pharm* **2001**, 334, 241-247.
- [29] Abadi, A.; Lankow, S.; Höfgen, B.; Decker, M.; Kassack, M. and Lehmann, J. Dopamine/Serotonin receptor ligands, Part III [1]: Synthesis and biological activities of 7,7'-alkylene-bis-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-benz[d]indolo[2,3-g]azecines - application of the bivalent ligand approach to a novel type of dopamine receptor antagonists. *Arch Pharm* **2002**, 335, 367-373.

- [30] Cingolani, G.; di Stefano, A.; Napolitani, F.; Mosciatti, B.; Giorgioni, G.; Cinone, N.; Brunetti, L.; Luisi, G.; Michelotto, B.; Orlando, G.; Costa, B.; Lucacchini, A.; Martini, C.; and Claudi, F. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of 5-hydroxy- and 5,6-dihydroxy-1,2,3,7,12,12a-hexahydrobenzo[5,6]cyclohepta[1,2,3-*ij*]isoquinoline derivatives as dopamine receptor ligands. *Bioorg Med Chem* **2001**, 9, 1446-1458.
- [31] Witt, T. Zur Synthese, Stereochemie und Pharmakologie fünf- und sechskerniger Chinolizine. *Dissertation Bonn* **1994**.
- [32] Meise, W. and Müller, H. Neue Synthese von Dibenzo[*a,h*]chinolizinen. *Synthesis* **1976**, 11, 719-721.
- [33] Van Binst, G. and Baert, R. Benzo- und Indoloquinolizine derivatives III. Synthesis and structural assignments of 4b,5,6,7,8,8a, 10,11-Octahydro-15b*H*-tribenzo-[*a,c,h*]quinolizine(4b,5,6,7,8,8a,10,11-Octahydro-15b*H*-isoquino[2,1-*f*]phenanthridine). *J Heterocyclic Chem* **1975**, 12, 1165-1174.
- [34] Vlaeminck, F.; De Cock, E.; Tourwe, D. and Van Binst, G. Benzo- and Indoloquinolizine derivatives XX. Synthesis and conformation of 5,6,8,9,14,14b-tetrahydro-13b-dibenzo[*a,h*]quinolizine and 5,6,8,9,14,14b-hexahydrobenzo[*a*]indolo[3,2-*h*]quinolizine. *Heterocycles* **1981**, 15, 1213-1218.
- [35] Schweikert, P. Dibenzo[*d,g*]- und Benzo[3,2-*g*]azecine als potentielle Arzneistoffe zur Behandlung der Schizophrenie. *Dissertation Bonn* **1999**.
- [36] Meise, W. and Schlüter, G. Synthese von Isochino[1,2-*a*][2]benzazepinen. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 639-641.
- [37] Schlüter, G. and Meise, W. Herstellung von 1-Phenyl-2-benzazepinderivaten durch Bischler-Napieralsky Reaktion. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 833-837.
- [38] Meise, W. and Schlüter, G. Isolierung und Charakterisierung der Zwischenprodukte der Isochino[1,2-*a*][2]benzazepin-Synthese - Darstellung weiterer Derivate. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1099-1101.
- [39] Meise, W.; Onusseit, O. and Clemens, M. Synthese von Isochino[1,2-*a*][*a*]benzazepinen und biochemische Testung isomerer Homoberbine und verwandter Papaverin-Derivate auf Hemmung der Phosphodiesterasen. *Pharmazie* **1999**, 54, 658-666.
- [40] Su, WY and Speranza, GP. Preparation of Phenoxyethanamines. [US 5276192], 1-6. 1994.
- [41] Gschwend, HW. Isoquinobenzazepines. Ciba-Geigy Corp. [US 3780043]. 1973.
- [42] Bremner, J.; Browne, E. and Gunawardana, I. Synthesis of 5-Aryl-1,4-benzoxazepine and 6-Phenyl-2*H*-1,5-benzoxazocine derivatives. *Aust. J. Chem.* **1984**, 37, 129-141.
- [43] Smith, K. and Morris, I. Synthesis of a novel macrocyclic lactone system. *Heterocycles* **1994**, 37, 1865-1869.

- [44] Schlüter, G. Die Bischler-Napieralsky-Reaktion zur Synthese von 1-Phenyl[2]-benzazepinen und Isochino[1,2-a][2]benzazepinen. *Dissertation Bonn* **1987**.
- [45] Klinkhammer, W. Untersuchungen zur Synthese von Benz[d]indolo[2,1-g]-azecin- Analoga, einer strukturell neuartigen Klasse von Dopamin Antagonisten. *Diplomarbeit Bonn* **2001**.
- [46] Becker, H. and Domschke, G. *Organikum*; Deutscher Verlag der Wissenschaften: Berlin, 1986; pp 460.
- [47] Enzensperger, C. Synthese von 12,13-Dimethoxy-7-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydro-5H-dibenzo[d,g]azacycloundecen als potentieller Dopamin-Rezeptorligand und Untersuchungen zu Synthesebausteinen zur Darstellung neuartiger Azecine. *Diplomarbeit Bonn* **2002**.
- [48] Büchi, G.; Francisco, M.; Liesch, J. and Schuda, P. A new synthesis of Aflatoxin M₁. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3497-3501.
- [49] Amabilino, D.; Ashton, P. and Boyd, S. Molecular meccano.17. Translational isomerism in some Two- and Three-Station Rotaxanes. *J. Org. Chem* **1997**, 62, 3062-3075.
- [50] Wheatley, W.; Fitzgibbon, W.; Cheney, L. and Binkley, B. o-Benzylphenyl-derivatives. IV. β -Chloroethylamines und vorangegangene Publikationen in dieser Serie. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 1655-1659.
- [51] Kikumoto, R.; Tobe, A. and Tonomura, S. Synthesis and antidepressant activity of substituted (ω -Aminoalkoxy)benzene derivatives. *J. Med. Chem* **1981**, 24, 145-148.
- [52] Riffkin, C. and Rubin, N. Syntheses of amino ethers with potential pharmacological activity. *Journal of the American Pharmaceutical Association* **1956**, 45, 317-320.
- [53] Hughes, D. The Mitsunobu Reaction. In *Organic Reactions*. 1992; pp 335-656.
- [54] Unangst, P.; Capiris, T.; Connor, D.; Doubleday, R.; Heffner, T.; Miller, S.; Puglsey, T. and Wise, L. (Aryloxy)alkylamines as Selective Human Dopamine D4 receptor antagonists: potential antipsychotic agents. *J Med Chem* **1997**, 40, 4026-4029.
- [55] Halazy, S. G-protein coupled receptors bivalent ligands and drug design. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1999**, 9, 431-446.
- [56] Mohr, P. *Dissertation in Arbeit* **2003**.
- [57] Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. and Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**, 193, 265-275.
- [58] Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-254.

- [59] Scatchard, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* **1949**, 51, 660-666.
- [60] Bennett, J. and Yamamura, H. Neurotransmitter, hormone or drug receptor binding methods. In *Methods in Neurotransmitter Receptor Binding*. Yamamura, H. e. al. Ed.; Raven press: 1985, 61-89
- [61] Lazareno, S. and Birdsall, N. Detection and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G-protein coupled receptors: Interaction of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **1995**, 48, 362-378.
- [62] Hill, A. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Proc)* **1910**, 40, 4-7.
- [63] Cheng, Y. and Prusoff, W. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, 22, 3099-3108.
- [64] DeBlasi, A.; O'Reilly, K. and Motulsky, H. Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* **1989**, 10, 227-229.
- [65] Malmberg, A.; Jerning, E. and Mohell, N. Critical reevaluation of spiperone and benzamide binding to dopamine D2 receptors: evidence for identical binding sites. *Eur J Pharmacol* **1996**, 303, 123-128.
- [66] Sedvall, G.; Farde, L.; Hall, H.; Halldin, C.; Karlsson, P.; Nordström, A.; Nyberg, S. and Pauli, S. Utilization of radioligands in schizophrenia research. *Clinical Neuroscience* **1995**, 3, 112-121.
- [67] Lahti, R.; Figur, L.; Piercey, M.; Ruppel, P. and Evans, D. Intrinsic activity determinations at the dopamine D2 guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor: utilization of receptor state binding affinities. *Mol Pharmacol* **1992**, 42, 432-438.
- [68] Seeman, P. and van Tol, H. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **1994**, 15, 264-270.
- [69] Mohr, P.; Schweikert, P.; Wittig, T.; Decker, M.; Elz, S. and Lehmann, J. Novel dibenzo[d,g]azecines show high affinity for human cloned dopamine receptors and high functional antagonistic activity at the rat arterial 5-HT_{2A} receptor. *Drugs Fut* **2002**, 27, 316.
- [70] Enzensperger, C. *Dissertation in Arbeit* **2003**.
- [71] Wittig, T.; Enzensperger, C. and Lehmann, J. Dopamine/Serotonin receptor ligands VI.¹ dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene and dibenz[d,g]-2-azacycloundecene: synthesis of two new heterocyclic ring systems as potential ligands for dopamine receptor subtypes. *Heterocycles* **2003**, 60, 887-898.

- [72] Mierau, J.; Schneider, F.; Ensinger, H.; Chio, C.; Lajiness, M. and Huff, R. Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors. *Eur J Pharmacol* **1995**, 290, 29-36.
- [73] pdsp databank. *web based databank*; 2003; <http://kidb.cwru.edu/pdsp.php>
- [74] Kassack, M.; Höfgen, B.; Lehmann, J.; Eckstein, N.; Quillan, J. and Sadee, W. Functional screening of G-Protein coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J Biomol Screening* **2002**, 7, 233-246.

Publikationsverzeichnis

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Wittig, TW.; Enzensperger, C. and Lehmann, J. Dopamine/Serotonin receptor ligands VI.: dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecene and dibenz[*d,g*]-2-azacyclo-undecene: synthesis of two new heterocyclic ring systems as potential ligands for dopamine receptor subtypes. *Heterocycles* **2003**, 60, 887-898

El-Subbagh, H.; Wittig, TW.; Decker, M.; Elz, S.; Nieger, M. and Lehmann J. Dopamine/Serotonine receptor ligands. Part IV: Synthesis and pharmacology of novel 3-benzazecines and 3-benzazonines as potential 5-HT_{2A} and dopamine receptor ligands. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 10, 1-6

Botka, C.; Wittig, TW.; Graul, R.; Nielsen, C. und Sadee, W. Human Proton/Oligopeptide Transporter (POT) genes: Identification of putative human genes using bioinformatics. *AAPS Pharmsci* **2000**, 2, 1-22

Kurzvorträge

Wittig, TW. and Lehmann, J. Dibenzo-oxa-azacycloundecenes and open chain analogs - synthesis and SAR studies. *Joint meeting on medicinal chemistry* **2003**, Krakau, abstract O1

Wittig, TW. and Lehmann J. 3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydro-dibenzo-[*g,j*][1,4]oxa-azacycloundecene, a novel heterocyclic system - affinities and selectivities at human cloned dopamine receptor subtypes compared to open chain analogs. (*DPhG-Jahrestagung*), *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 335 (Suppl. 1), 48

Posterpräsentationen

Enzensperger, C.; Wittig, TW.; Mohr, P. and Lehmann J. Methoxylation, hydroxylation and ring-size modify the affinity of novel dopamine receptor ligands. *DPhG-Jahrestagung* **2003**, C23

Mohr, P.; Schweikert, PM.; Wittig, TW.; Decker, M.; Elz, S. and Lehmann J. Novel dibenzo[*d,g*]azecines show high affinity for human dopamine - and rat arterial 5-HT_{2A} receptor subtypes. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. (Suppl. 1)* **2002**, 335, 91

Wittig, TW. and Lehmann J. 3-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydro-dibenzo-[*g,*][1,4]oxa-azacycloundecene, a novel heterocyclic system - affinities and selectivities at human cloned dopamine receptor subtypes compared to open chain analogs. *Drugs Fut (Suppl. A)* **2002**, 27, P 335

Mohr, P.; Schweikert, PM.; Wittig, TW.; Decker, M.; Elz, S. and Lehmann J. Novel dibenzo[*d,g*]azecines show high affinity for human cloned dopamine receptors and high functional antagonistic activity at the rat arterial 5-HT_{2A} receptor. *Drugs Fut (Suppl. A)* **2002**, 27

Lankow, S.; Ashraf, A.; Decker, M.; Wittig, TW.; Mohr, P.; Höfgen, B.; Kassack, M. and Lehmann J. Benz[*d*]indolo[2,3-*g*]azecine - and dibenzo[*d,g*]azecine-dimers with variable spacer length show significant affinity to the human dopamine receptor subtypes. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. (Suppl. 2)* **2001**, 334, 41

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 1. Dezember 2003

Lebenslauf

Thomas Wilhelm Wittig

Geburtsdatum: 17. August 1973
Geburtsort: Haan / Rhld.
Eltern: Dr. med. Hans-Dieter Wittig und Angelika Doerner

Schul Ausbildung

1980-1984: Gemeinschaftsgrundschule Mettmann
1984-1993: Konrad-Heresbach-Gymnasium Mettmann
Juni 1993: Abitur

Studium

1993-1995: Chemie, Rhein. Friedr. Wilhelms Universität Bonn
1995-1998: Pharmazie, Rhein. Friedr. Wilhelms Universität Bonn
September 1998: Zweites Staatsexamen Pharmazie

Praktische Ausbildung

August 1995: Sternenburg Apotheke Bonn (Famulatur)
Juli 1996: SCHWARZ Pharma AG, Pharmazeutische
Qualitätssicherung (Famulatur)
Oktober 1998 - März 1999: Kekulé Apotheke Bonn (Pharmaziepraktikum)
Mai – Oktober 1999: Dept. of Biopharmaceutical Sciences, University of
California San Francisco (Pharmaziepraktikum)
Februar 2000: Drittes Staatsexamen Pharmazie und
Approbation als Apotheker

Wissenschaftliche Tätigkeit

Nov. 1999 – März 2001: Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn
(Wissenschaftliche Hilfskraft)
April 2001 – März 2002: Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn
(Wissenschaftlicher Mitarbeiter)
seit April 2002: Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität
Jena (Wissenschaftlicher Mitarbeiter)

